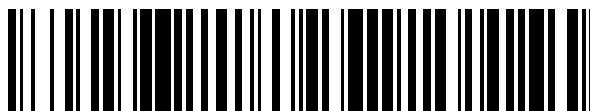


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 458**

51 Int. Cl.:

A61F 2/07 (2013.01)
A61F 2/82 (2013.01)
A61L 31/16 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2018 PCT/IB2018/055566**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19025908**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2018 E 18841759 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2022 EP 3661454**

54 Título: **Dispositivo y método para promover la cobertura rápida de malla estructural y la cobertura endotelial vascular**

30 Prioridad:

31.07.2017 US 201762539356 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2023

73 Titular/es:

DO CANTO ZAGO, ALEXANDRE (100.0%)
Rua Antonio Parreiras 120 / 402
90450-050 Porto Alegre - RS, BR

72 Inventor/es:

DA SILVA ROSSATO, JULIANE;
ZAGO, ALCIDES JOSE;
PINHEIRO DO NASCIMENTO, LUDMILA y
DO CANTO ZAGO, ALEXANDRE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 938 458 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método para promover la cobertura rápida de malla estructural y la cobertura endotelial vascular

5 Campo técnico

La invención se refiere en general a un campo de un dispositivo médico y más particularmente a un dispositivo y un método para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular.

10 Antecedentes de la invención

Los stents liberadores de fármacos (SLF) redujeron significativamente las tasas de reestenosis en comparación con los stents metálicos sin recubrimiento (SMR), pero retrasaron significativamente la velocidad de reendotelización del stent y aumentaron las tasas de trombosis del stent, lo que requirió el uso prolongado de terapia antiplaquetaria dual (TAPD) para minimizar estas altas tasas de trombosis.

Por lo tanto, la duración del TAPD aumentó de 30 días en el caso de SMR a 12 meses cuando se utilizó SLF. Dicha duración a largo plazo de TAPD tiene impactos clínicos y económicos.

Entre tales impactos clínicos se encuentran el aumento del riesgo de sangrado, especialmente en pacientes predispuestos a este, como antecedentes recientes de sangrado gastrointestinal, accidente cerebrovascular hemorrágico, malformaciones arteriovenosas, tumores, etc., así como pacientes que necesitan el uso concomitante de anticoagulantes orales como fibrilación auricular, aleteo auricular, presencia de válvula cardíaca protésica, trombofilias y/o antecedentes recientes de trombosis venosa profunda y/o embolismo pulmonar, entre otros.

Otro aspecto clínico importante es la necesidad de cirugías o procedimientos dentales. Los pacientes bajo TAPD no pueden someterse a procedimientos quirúrgicos o dentales; por lo tanto, un procedimiento quirúrgico o dental debe posponerse siempre que sea posible hasta el final del TAPD de 12 meses, lo que, en la mayoría de los casos, no es posible y requiere que el paciente suspenda el TAPD durante al menos 5 días antes de la cirugía y, por lo general, reiniciarlo 2 días después de una cirugía mediana o mayor, aumentando así las tasas de trombosis del stent en este período y, en consecuencia, las de infarto agudo de miocardio por oclusión del stent.

Finalmente, los hematomas son una queja frecuente principalmente entre los pacientes ancianos sometidos a TAPD prolongado. En algunos casos, la fragilidad capilar es tal que el paciente no la tolera y debe suspenderse el TAPD antes de que transcurra el tiempo recomendado.

En cuanto al aspecto económico, las tienopiridinas y los inhibidores del receptor P2Y12 son fármacos de alto coste; por tanto, el impacto económico sobre los individuos y, especialmente, sobre los sistemas sanitarios públicos, se vuelve significativo cuando se prolonga el TAPD de 30 días en SMR a 12 meses en SLF.

Los SLF actualmente disponibles administran localmente fármacos antiproliferativos como sirolimus o sus análogos, es decir, everolimus, biolimus, zotarolimus y otros. El paclitaxel es otra clase de fármacos antiproliferativos que se usó en los SLF de primera generación, pero luego se suspendió; sin embargo, este fármaco antiproliferativo se utiliza en la actualidad en prácticamente todos los BLF (balones liberadores de fármacos) disponibles en la actualidad. El documento US20160058923A divulga composiciones, dispositivos, injertos y métodos para reducir o prevenir la antineointima después de lesiones e intervenciones cardiovasculares, que típicamente incluyen una cantidad eficaz de un inhibidor de CTP sintasa 1. C. Gareri et al. divulgan que el cambio fenotípico de las SMC vasculares es uno de los principales eventos responsables de la reestenosis intrastent después de la intervención coronaria percutánea ("miR-125a-5p Modulates Phenotypic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells by Targeting ETS-1", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 429 (12), 01-06-2017, 1817-1828, XP055787544 XP055787544). Emi Arakawa et al. divulgan que la benidipina reduce la hiperproliferación de CMLV después de una lesión con balón ("Benidipine, a Calcium Channel Blocker, Regulates Proliferation and Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells", JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 100 (2), 2006, 149-156, XP055787546). Harald Bär et al. divulgan que después de la angioplastia con balón, la esmotelina se regula a la baja durante la proliferación/formación de neointima de SMC vasculares desdiferenciadas ("Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries", BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY, vol. 97 (1), 2002, 9-16, XP002497036).

Tanto el sirolimus y sus análogos como el paclitaxel son agentes antiproliferativos con actividad no selectiva sobre un determinado tipo de células, es decir, inhiben la proliferación de cualquier tipo de células como las células del músculo liso vascular (CMLV) y las células endoteliales (CE) en una forma genérica y extensiva. El sirolimus y sus análogos actúan inhibiendo la proliferación celular en la fase del ciclo celular G1-S al unirse a la proteína de unión 12 del receptor intracelular FK (FKBP12) y, en consecuencia, inhibiendo la vía de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR). (Abe M, Kimura T, Morimoto T, Taniguchi T, Yamanaka F, Nakao K, et al. Sirolimus-eluting stent versus balloon angioplasty for sirolimus-eluting stent restenosis: Insights from the j-Cypher Registry. Circulation. 2010; 122:42-51). La vía mTOR bloquea la interfase celular, impidiendo la progresión del ciclo celular de G1 a S, por lo que, sin la síntesis

de ADN, la célula no puede realizar la mitosis (Yano H, Horinaka S, Yagi H, Ishimitsu T. Comparison of inflammatory response after implantation of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in patients on hemodialysis. *Heart Vessels*. 2012; Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. *Circ J*. 2011; 75:1287-96). Paclitaxel también promueve el bloqueo del ciclo celular, pero a través de un mecanismo diferente al sirolimus. Paclitaxel actúa en la fase G2-M del ciclo celular, impidiendo que la célula pase de la fase G2 de la interfase al inicio de la mitosis (Cheng H, An SJ, Zhang XC, Dong S, Zhang YF, Chen ZH, et al. In vitro sequence-dependent synergism between paclitaxel and gefitinib in human lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67:637-46). Siendo así, el paclitaxel actúa sobre la formación de microtúbulos, que son elementos fundamentales para la formación del huso mitótico y la orientación de los cromosomas durante el proceso de división celular (Pires NM, Eefting D, de Vries MR, Quax PH, Jukema JW. Sirolimus and paclitaxel provoke different vascular pathological responses after local delivery in a murine model for restenosis on underlying atherosclerotic arteries. *Heart*. 2007; 93:922-7).

La búsqueda del dispositivo médico ideal ha estado en curso desde que comenzaron las intervenciones coronarias con catéteres con balón. Varios dispositivos médicos como los dispositivos de ateroablación (aterectomía direccional y aterectomía rotacional - rotablator) así como los stents metálicos fueron evaluados en la década de los 90, habiendo mostrado los stents metálicos los mejores resultados clínicos al compararlos con balón, aterectomía direccional y rotablator. A pesar de los avances en el aumento de las tasas de éxito de los procedimientos y la reducción de las tasas de reestenosis gracias al advenimiento de los SMR, la reestenosis intrastent (RIS) se mantuvo alta, variando del 20 al 50 %, según las características clínicas y angiográficas del paciente.

Se logró un nuevo avance significativo a principios de la década de 2000 con la llegada de SLF que redujo significativamente el ISR; sin embargo, dicho SLF retrasó significativamente la reendotelización del stent y, como resultado, aumentó las tasas de trombosis del stent y, en consecuencia, la duración del TAPD. Por lo tanto, la búsqueda de un dispositivo médico que asegure simultáneamente tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo como la reendotelización temprana del segmento del vaso tratado, es decir, que sea capaz de inhibir la proliferación de CMLV y no interferir o incluso estimular la producción de CE y la deposición sigue siendo necesaria.

Dado que los fármacos antiproliferativos como sirolimus y/o análogos y paclitaxel retrasan el restablecimiento del endotelio en la superficie interna del stent, esta falta de un mecanismo protector en la pared vascular permite el desarrollo de hiperplasia neointimal (Tarantini G, Facchin M, Capodanno D, Musumeci G, Saia F, Menozzi A, et al. Paclitaxel versus sirolimus eluting stents in diabetic patients: does stent type and/or stent diameter matter?: long-term clinical outcome of 2,429-patient multicenter registry. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013; 81:80-9). Los estudios muestran que la reendotelización temprana previene la reestenosis; por lo tanto, un SLF que eluya un fármaco capaz de inhibir CMLV y promueva una rápida reendotelización probablemente ofrecería beneficios adicionales con una superioridad potencialmente mayor en la inhibición de CMLV sobre los fármacos antiproliferativos utilizados en los SLF actuales. El endotelio cumple una función importante en la regulación del tono vascular y en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular, lo que es determinante del control de la trombólisis, remodelación vascular y respuesta inflamatoria por la activación del sistema inmunitario (Luz PL. Endotélío e doenças cardiovasculares. São Paulo: Ateneu; 2005.; Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J*. 1996; 131:379-84).

Los SLF actualmente disponibles muestran una ISR promedio de solo el 8 % mediante la formación controlada de neoíntima a través de la inhibición de la hiperproliferación de CMLV. Esta baja tasa de ISR se atribuye principalmente a problemas mecánicos como la mala aposición del stent, el stent de tamaño insuficiente o el stent subexpandido. Por lo tanto, la cuestión más importante con respecto a la mejora de los SLF actuales se basa en la reendotelización del stent, ya que estos fármacos antiproliferativos inhiben tanto las CMLV como las CE. Por lo tanto, dicho retraso en la reendotelización del stent provoca impactos negativos clínicos y financieros significativos, como ya se mencionó anteriormente.

Por lo tanto, actualmente se requiere un fármaco capaz de inhibir CMLV sin interferir con la proliferación de CE para crear un dispositivo médico que promueva mallas estructurales rápidas y/o cobertura endotelial vascular. Los dos silenciadores génicos de cadena pesada de miosina 11 (MYH11)-ARNip y calponina 1 (CNN1)-ARNip se identifican como los fármacos más eficaces para un dispositivo médico utilizado para desobstruir los vasos sanguíneos. Las principales ventajas de un dispositivo médico que eluye MYH11-ARNip o CNN1-ARNip es que tales dispositivos médicos que eluyen silenciadores génicos previenen simultáneamente la reobstrucción vascular debido a la inhibición eficiente de la hiperproliferación de CMLV y promueven la reendotelización temprana ya que los silenciadores génicos MYH11-ARNip y CNN1-ARNip no inhiben la proliferación de CE.

En experimentos adicionales, se encontró que los silenciadores génicos leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmootelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip también son efectivos para inhibir la hiperproliferación de CMLV así como para promover la reendotelización temprana ya que tales silenciadores génicos tampoco inhiben significativamente la proliferación de CE. Por lo tanto, además de los dispositivos médicos que liberan MYH11-ARNip y CNN1-ARNip, liberan LMOD-ARNip, liberan SMTN-ARNip, liberan TPM-ARNip, liberan CALD-ARNip, liberan ACTA-ARNip, también se incluyen dispositivos médicos que liberan ACTN-ARNip y ACTB-ARNip.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

La invención supera el problema anterior mediante la introducción de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 y un dispositivo para usar en un método para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular de acuerdo con la reivindicación 10. La invención inhibe la hiperproliferación de CMLV y promueve la reendotelización temprana de los vasos sanguíneos.

En vista de lo anterior, una realización del presente documento proporciona un dispositivo y un dispositivo para usar en un método para inhibir la hiperproliferación de CMLV y promover la reendotelización temprana de los vasos sanguíneos.

Una realización en el presente documento proporciona un dispositivo para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular. El dispositivo comprende un dispositivo médico de elución y al menos un silenciador génico. El dispositivo de elución se recubre o se rellena con al menos un silenciador génico. El silenciador génico se selecciona de la cadena pesada de miosina 11 (MYH11)-ARNip, calponina 1 (CNN1)-ARNip, leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmotelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip. El silenciador génico se administra localmente en el vaso sanguíneo para ingresar a la pared del vaso y CMLV para la inhibición selectiva de la hiperproliferación de CMLV sin inhibir la proliferación de CE.

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], el dispositivo comprende un vehículo silenciador génico que facilita la elución del silenciador génico. El vehículo silenciador génico permite que el silenciador génico entre en la pared de los vasos sanguíneos y en las células del músculo liso vascular. En la misma realización, el vehículo silenciador génico se selecciona de un grupo de lentivirus y plásmidos, nanopartículas, fluoropolímeros, polímeros bioabsorbibles, polímeros no absorbibles, o incluso puede estar libre de polímeros (sin ningún tipo de polímero).

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], el dispositivo médico de elución se selecciona de cualquier dispositivo implantable y dispositivo de administración local de fármacos no implantable.

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], el dispositivo implantable se selecciona de un stent metálico y un armazón vascular bioabsorbible (AVB).

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], el dispositivo de administración local de fármacos no implantable se selecciona de BLF, catéter de administración local de fármacos y cualquier otro dispositivo médico capaz de administrar localmente MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip.

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], el silenciador génico se administra solo o en combinación con otro ARNip o con fármacos antiproliferativos celulares.

En la realización relacionada con el dispositivo mencionado en el párrafo [018], la concentración del silenciador génico varía de 1 µg/ml a 1000 µg/ml, que es un rango de concentración amplio, ya que el silenciador génico se puede esparcir sobre la superficie del dispositivo médico desde una sola capa muy delgada hasta varias capas gruesas para alcanzar la cantidad deseada de silenciador génico que se administrará localmente.

Una realización en el presente documento describe un dispositivo médico de elución para uso en un método para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular. El método comprende:

- a) un dispositivo médico de elución y al menos un silenciador génico; y
- b) un dispositivo médico de elución cubierto o relleno con al menos un silenciador génico;
- c) el silenciador génico se selecciona de: cadena pesada de miosina 11 (MYH11)-ARNip, calponina 1 (CNN1)-ARNip, leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmotelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip;
- d) el silenciador génico promueve la reendotelización temprana del segmento de vasos sanguíneos inhibiendo solo la hiperproliferación de CMLV, por lo que el silenciador génico no interfiere significativamente con la producción de CE o incluso puede estimularla;
- e) el silenciador génico se administra a un segmento diana del vaso sanguíneo;

f) el silenciador génico se puede cargar en un vehículo silenciador génico;

g) el vehículo silenciador génico facilita la elución del silenciador génico;

h) el vehículo del silenciador génico permite que el silenciador génico entre en la pared del vaso sanguíneo diana y en las células del músculo liso vascular; y

i) el silenciador génico se puede cargar directamente en la superficie del dispositivo (sin vehículo) o incluso en el dispositivo.

En una de las realizaciones, el método facilita tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo como la reendotelización temprana de un segmento de vaso tratado.

Estos y otros aspectos de las realizaciones del presente documento se apreciarán y entenderán mejor cuando se consideren junto con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Debe entenderse, sin embargo, que las siguientes descripciones, aunque indican realizaciones preferidas y numerosos detalles específicos de las mismas, se dan a modo de ilustración y no de limitación.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo silenciador génico lentivirus y plásmido;

La Fig. 2 describe una proliferación de CE en frascos que contienen CE humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo silenciador génico lentivirus y plásmido;

La Fig. 3 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo silenciador génico lentivirus y plásmido;

La Fig. 4 describe la proliferación de CE en frascos que contienen CE humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo silenciador génico lentivirus y plásmido;

La Fig. 5 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo silenciador génico lentivirus y plásmido;

La Fig. 6 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo de silenciadores génicos y fármacos antiproliferativos celulares nanopartículas; y

La Fig. 7 describe la proliferación de CE en frascos que contienen CE humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo de los silenciadores génicos y fármacos antiproliferativos celulares las nanopartículas.

La Fig. 8 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo de los silenciadores génicos y los fármacos antiproliferativos celulares las nanopartículas.

La Fig. 9 describe la proliferación de CE en frascos que contienen CE humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento, siendo el vehículo de los silenciadores génicos y los fármacos antiproliferativos celulares las nanopartículas.

La Fig. 10 describe la proliferación de CMLV en frascos que contienen CMLV humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento en diferentes dosis crecientes, siendo el vehículo de los silenciadores génicos y los fármacos antiproliferativos celulares las nanopartículas.

La Fig. 11 describe la proliferación de CE en frascos que contienen CE humana de acuerdo con los siguientes grupos de tratamiento en diferentes dosis crecientes, siendo el vehículo de los silenciadores génicos y los fármacos antiproliferativos celulares las nanopartículas.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Las realizaciones de este documento y las diversas características y detalles ventajosos de las mismas se explican más completamente con referencia a las realizaciones no limitativas que se ilustran en los dibujos adjuntos y se detallan en la siguiente descripción. Se omiten las descripciones de componentes y técnicas de procesamiento bien conocidos para no oscurecer innecesariamente las realizaciones de este documento. Los ejemplos utilizados en el

presente documento están destinados simplemente a facilitar la comprensión de las formas en que se pueden practicar las realizaciones del presente documento y permitir además a los expertos en la técnica practicar las realizaciones del presente documento. De acuerdo con lo anterior, los ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de las realizaciones del presente documento.

Las realizaciones del presente documento logran esto al proporcionar un dispositivo y un dispositivo de elución para usar en un método para inhibir la hiperproliferación de CMLV y promover la reendotelización temprana de los vasos sanguíneos. Los intentos de desarrollar un dispositivo médico que proporcione tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo como la reendotelización temprana del segmento del vaso tratado, es decir, un dispositivo capaz de inhibir la hiperproliferación de CMLV y que no interfiera o incluso estimule la producción de CE y la deposición local, se ha hecho desde el advenimiento de la Cardiología Intervencionista.

Los SLF actuales eluyen fármacos antiproliferativos que reducen significativamente las tasas de reestenosis en comparación con SMR; sin embargo, los beneficios del SLF se lograron a expensas de un retraso significativo en la reendotelización del stent y, como resultado, un aumento de las tasas de trombosis del stent y, en consecuencia, una duración prolongada de la TAPD. Por lo tanto, solo una parte del problema se resolvió correctamente con el SLF actualmente disponible.

Por lo tanto, se requiere un dispositivo médico que asegure simultáneamente tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo, como lo hacen los SLF actuales, como la reendotelización temprana del segmento del vaso tratado, que sigue siendo un problema para los SLF actuales. Es decir, la búsqueda de un dispositivo médico capaz tanto de inhibir la proliferación como de la migración de CMLV hacia la superficie interna del vaso, lo que provoca la obstrucción del lumen del vaso, y que no interfiera o incluso estimule la producción de CE y la deposición local.

En una de las realizaciones, se realizó una búsqueda de objetivos genéticos para identificar un agente capaz de inhibir significativamente la hiperproliferación de CMLV y, simultáneamente, no interferir con la proliferación de CE. Por lo tanto, se realizó un estudio clínico en fragmentos de tejido de placas restenóticas en el Experimento 1 que identificó dos objetivos genéticos potenciales. Por lo tanto, la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, el miembro 11b (TNFRSF11B)-ARNip y los silenciadores del gen del factor citosólico de neutrófilos 4 (NCF4)-ARNip se evaluaron en el Experimento 2, que fue un experimento in vitro, que comparó los silenciadores génicos TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip con fármacos antiproliferativos (sirolimus y paclitaxel) que demostraron tener un efecto inhibitorio sobre la hiperproliferación de CMLV así como para controlar silenciadores génicos sin efecto inhibitorio sobre CMLV y CE descritos previamente en la literatura o incluso sin justificación teórica para actuar de forma inhibitoria sobre la proliferación de CMLV y CE (proteína de músculo liso 22a (SM22a)-ARNip y MYH11-ARNip).

Las realizaciones en este documento proporcionan los resultados del Experimento 2 en el que los dos silenciadores de genes, TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip, no demuestran los beneficios esperados, mientras que uno de los silenciadores génicos utilizados como control del vehículo de lentivirus, MYH11-ARNip, muestra inhibición significativa de la proliferación de CMLV. Luego, se realizó el Experimento 3 para confirmar los resultados del Experimento 2. Finalmente, en el Experimento 4 se probaron otros silenciadores génicos de proteínas estructurales y funcionales de CMLV (MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, cadena ligera de miosina 9 (MYL9)-ARNip, TRIO y proteína de unión a actina F (TRIOBP)-ARNip, miosina quinasa de cadena ligera (MYLK)-ARNip, y proteína que interactúa con Rho miosina fosfatasa (MPRIP)-ARNip), siendo CNN1-ARNip y MYH11-ARNip los únicos silenciadores génicos que muestran una inhibición significativa de la proliferación de CMLV.

En cuanto a CE, los silenciadores génicos TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip no provocan una inhibición significativa de su proliferación, lo que ya era de esperar, ya que el objetivo en relación con estas dianas terapéuticas es no interferir o interferir lo menos posible con proliferación de CE. Los otros silenciadores génicos evaluados como controles, entre ellos el MYH11-ARNip y el CNN1-ARNip, tampoco mostraron una inhibición significativa de la proliferación de CE, lo que ya se esperaba ya que estos silenciadores génicos se eligieron como controles porque, de acuerdo con los datos disponibles en la literatura, no interfieren ni con CMLV ni con la proliferación de CE. La inhibición significativa de la CE en los grupos sirolimus y paclitaxel es bien conocida y está descrita en la literatura, como ya se discutió anteriormente cuando se trató el problema de la trombosis del stent.

El uso de lentivirus y plásmidos para la transfección de silenciadores génicos en células es un método común y demostrablemente efectivo. Sin embargo, este método puede ser difícil de aplicar a la fabricación de SLF, AVB, BLF y otros dispositivos que a menudo se esterilizan mediante procesos que implican altas temperaturas, como el óxido de etileno (OET). Por lo tanto, en el Experimento 5 se evaluaron nanopartículas como portadores de silenciadores génicos con resultados satisfactorios.

El Experimento 6 fue el primer estudio in vivo que evaluó y probó la eficacia tanto del stent liberador de ARNip de MYH11 como del stent liberador de ARNip de CNN1 para promover la inhibición sostenida de la hiperplasia en el stent (como el stent liberador de sirolimus), así como en permitir la reendotelización rápida de las mallas estructurales del stent (como un stent de metal sin recubrimiento) a través de un mecanismo de acción que no se describe en la literatura médica.

Luego, en base a los muy prometedores resultados de MYH11-ARNip y CNN1-ARNip, se evaluaron 32 silenciadores génicos adicionales relacionados con proteínas estructurales y funcionales de CMLV humana en el Experimento 7 in vitro que reveló la eficacia de LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip en la inhibición significativa de la proliferación de CMLV humana sin interferir con la proliferación de CE humana. Sin embargo, el Experimento 7 también mostró que los 9 silenciadores génicos efectivos identificados tienen diferente potencia o eficacia en la inhibición de CMLV humana cuando se usan las mismas dosis.

Finalmente, para evaluar la relación entre la dosis del silenciador génico y la potencia/eficacia en la inhibición de CMLV humana, se realizó el Experimento 8 y se demostró que los silenciadores génicos tienen una amplia gama de dosis en las que son efectivos y su efectividad no depende de la dosis. Además, dosis altas o muy altas de silenciadores génicos no interfieren con la proliferación de CE humana.

Por lo tanto, en una de las realizaciones, la concentración del silenciador génico oscila entre 1 µg/ml y 1000 µg/ml, que es un amplio rango de concentración, ya que el silenciador génico se puede esparcir sobre la superficie del dispositivo médico desde una única capa muy fina hasta a varias capas gruesas para alcanzar la cantidad deseada de silenciador génico que se administrará localmente.

Los 8 experimentos descritos en este documento mostraron evidencia de que MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip son los únicos silenciadores génicos capaces de inhibir la proliferación de CMLV de una manera incuestionable, que no es un efecto de clase de los silenciadores génicos de las proteínas estructurales y funcionales de CMLV porque todos los demás silenciadores génicos probados que pertenecen a estas clases de silenciadores génicos no pueden mostrar el mismo efecto en la inhibición de proliferación de CMLV.

En consecuencia, los 9 silenciadores génicos MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip tienen un efecto muy particular en la inhibición de la CMLV humana, que no es extensible a todos los otros silenciadores génicos de su clase. Este efecto específico de MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip son su actividad contra una o más proteínas clave en el Proceso de proliferación de CMLV, es decir, la inhibición de una o más proteínas fundamentales para la formación de CMLV jóvenes, ya que todas las 9 proteínas MYH11, CNN1, LMOD, SMTN, TPM, CALD, ACTN, ACTA y ACTB pertenecen a CMLV maduras. Por lo tanto, para entender la ISR, una posible plasticidad desarrollada por las células quiescentes puede resultar de un cambio fenotípico celular que permite que los genes previamente activados solo en el período embrionario comiencen a expresarse nuevamente, generando un alto potencial proliferativo. Otro posible mecanismo es la actividad de MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip contra una o más proteínas o sus mecanismos de acción.

Los resultados con respecto a la inhibición de la proliferación de CMLV por MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip no solo plantean varias preguntas sino también traen algunas certezas como el hecho de que el mecanismo ISR es mucho más complejo de lo que se pensaba y que una o más vías metabólicas silenciadas por MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip son de extrema importancia para la hiperproliferación de CMLV.

En otra realización, el dispositivo médico consta de:

- a) dispositivo médico que eluye MYH11-ARNip;
- b) dispositivo médico que eluye CNN1-ARNip,
- c) dispositivo médico que eluye LMOD-ARNip,
- d) dispositivo médico que eluye SMTN-ARNip,
- e) dispositivo médico que eluye TPM-ARNip,
- f) dispositivo médico que eluye CALD-ARNip,
- g) dispositivo médico que eluye ACTN-ARNip,
- h) dispositivo médico que eluye ACTA-ARNip; y
- i) dispositivo médico que eluye ACTB-ARNip

en el que todos estos silenciadores génicos no interfieren significativamente con la proliferación de CE humana. Por lo tanto, a diferencia de los SLF que eluyen fármacos antiproliferativos celulares como sirolimus o análogos y paclitaxel

que inhiben la proliferación de CE vascular humana y, en consecuencia, retrasan la reendotelización temprana del stent, todos los siguientes dispositivos médicos que liberan MYH11-ARNip-, CNN1-ARNip-, LMOD-ARNip-, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip que pueden promover la reendotelización temprana de stent, AVB o vasos.

Otro aspecto importante relacionado con la reendotelización temprana son los estudios que muestran beneficios potenciales de la reendotelización temprana con respecto a la ISR; por lo tanto, la reendotelización temprana estimulada mediante el dispositivo médico que eluye MYH11-ARNip-, CNN1-ARNip-, LMOD-ARNip-, SMTN-ARNip-, TPM-ARNip-, CALD-ARNip-, ACTN-ARNip-, ACTA-ARNip- y ACTB-ARNip es capaz de promover beneficios adicionales en la inhibición de la hiperproliferación de CMLV en comparación con los dispositivos médicos que liberan fármacos antiproliferativos celulares disponibles actualmente. Dado que los fármacos antiproliferativos celulares como el sirolimus y sus análogos y el paclitaxel retrasan el restablecimiento del endotelio en la superficie interna del stent, esta falta de un mecanismo protector en la pared vascular posibilita el desarrollo de hiperplasia neointimal y, en consecuencia, ISR.

El vehículo silenciador génico utilizado para la administración local de cualquiera de los 9 silenciadores génicos puede ser cualquier vehículo que permita MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip para entrar en CMLV humana; por lo tanto, puede ser cualquier cosa, desde lentivirus y plásmidos, nanopartículas, fluoropolímeros, polímeros bioabsorbibles y polímeros no absorbibles hasta dispositivos médicos recubiertos con MYH11-ARNip sin polímeros, dispositivos médicos recubiertos con CNN1-ARNip sin polímeros, dispositivos médicos recubiertos con LMOD-ARNip sin polímeros, dispositivo médico recubierto con SMTN-ARNip sin polímeros, dispositivo médico recubierto con TPM-ARNip sin polímeros, dispositivo médico recubierto con CALD-ARNip sin polímeros, dispositivo médico recubierto con ACTN-ARNip sin polímeros, dispositivo médico recubierto con ACTA-ARNip sin polímeros y dispositivo médico recubierto con ACTB-ARNip sin polímeros, o incluso cualquier otro vehículo de dispositivo médico, ya que lo más importante es garantizar que los silenciadores génicos MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y/o ACTB-ARNip entran en la pared del vaso y CMLV.

El dispositivo médico de elución debe recubrirse o rellenarse con MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip o ACTB-ARNip plus preferentemente pero no necesariamente un vehículo, siendo el dispositivo médico cualquier dispositivo implantable como un stent metálico, AVB y/u otro dispositivo implantable o cualquier dispositivo local no implantable de administración de fármacos como un BLF, un catéter local de administración de fármacos y/u otro dispositivo médico capaz de administrar localmente MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip.

Los silenciadores génicos MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip pueden administrarse localmente solos, juntos o en combinación con otro ARNip y/o fármacos antiproliferativos celulares y/u otros fármacos, ya que el principal mecanismo de acción, que es la inhibición selectiva y significativa de la hiperproliferación de CMLV sin inhibir significativamente la proliferación de CE, se basa en los silenciadores génicos MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip.

La identificación y evaluación de nuevos fármacos con actividad inhibidora selectiva y eficiente de las CMLV, así como sin interferencia con la proliferación de CE, se realizó a través de un estudio clínico (Experimento 1), algunos estudios in vitro (Experimentos 2,3,4,5,7 y 8) y un estudio in vivo (Experimento 6) para apoyar la invención.

Experimento 1

De los 27 pacientes que se sometieron a aterectomía direccional con el catéter Flexicut (Guidant, EE. UU.) para retirar fragmentos de placas de ISR y placas de arteria coronaria de novo, 12 pacientes tenían ISR y 15 pacientes tenían lesiones de arteria coronaria de novo sintomáticas. Las muestras de aterectomía (placas) se identificaron, se colocaron en ARN Stat 60 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el análisis de perfiles genéticos de más de 22 000 genes. El ARN se aisló de muestras de aterectomía mediante homogeneización con un homogeneizador PowerGen modelo 125 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), seguido de extracción con 0.2 volúmenes de cloroformo, precipitación con 0.5 volúmenes de isopropanol, lavado en etanol al 75 % y suspensión en RNasa-libre de agua. La concentración de ARN se midió mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La calidad y la pureza del ARN se evaluaron mediante el ensayo pico o nano RNA 6000 con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE. UU.).

Las muestras se etiquetaron para el perfil de expresión génica utilizando el sistema de microarrays Affymetrix Gene Chip (Affymetrix, EE. UU.). Se usó un protocolo de amplificación estándar basado en T7 (Affymetrix) para convertir el ARN en ARNc biotinilado. El ARNc marcado con biotina fragmentado se hibridó con matrices Affymetrix Gene Chip Human Genome U133A de acuerdo con el protocolo estándar de Affymetrix. Los operadores, los lotes de chips y los escáneres (GeneArray 3000, Affymetrix) se controlaron en todo momento. Los controles de calidad de las matrices que utilizaron el software operativo GeneChip incluyeron el factor de escala y el porcentaje de genes presentes.

Se compararon los perfiles de expresión génica de placas de ISR con los perfiles de expresión génica de placas de arteria coronaria de novo; solo los genes expresados más de 15X en las placas ISR se consideraron significativos.

- 5 Se encontró que dos genes se expresaban más de 15X, es decir, la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 11b (TNFRSF11B), que se expresaba 18X más en las placas de ISR en comparación con las placas de arteria coronaria de novo, y el factor citosólico de neutrófilos 4 (NCF4) que se expresó 16X más en las placas ISR.

- 10 El gen TNFRSF11B codifica un miembro de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral (TNF), que es un ligando de la osteoprotegerina y funciona como un factor clave para la diferenciación y activación de los osteoclastos. Se demostró que esta proteína es un factor de supervivencia de las células dendríticas y está involucrada en la regulación de la respuesta inmune dependiente de las células T. Se informó que la activación de células T induce la expresión de este gen y conduce a un aumento de la génesis de osteoclasto y pérdida ósea. Se demostró que esta proteína activa la cinasa antiapoptótica AKT/PKB a través de un complejo de señalización que involucra a la cinasa SRC y al factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF 6), lo que indica que esta proteína puede tener una función en la regulación de la apoptosis celular.

- 15 El NCF4 codifica una proteína que es un componente regulador citosólico de la NADPH-oxidasas del fagocito productor de superóxido, un sistema enzimático multicomponente importante para la defensa del huésped. Esta proteína se expresa preferentemente en células de linaje mieloide. Interactúa principalmente con el factor citosólico de neutrófilos 2 (NCF2/p67-phox) para formar un complejo con el factor citosólico de neutrófilos 1 (NCF1/p47-phox), que además interactúa con la pequeña proteína G RAC1 y se transloca a la membrana tras la estimulación celular.

Experimento 2

- 25 Tras identificar 2 genes con alto potencial para modular la respuesta inflamatoria que provoca la ISR en el Experimento 1, se evaluó la respuesta terapéutica neutralizando dichos 2 genes (TNFRSF11B & NCF4) en frascos que contenían CMLV humana o CE vascular humana mediante silenciadores génicos que son una secuencia específica de ARN de interferencia que bloquea la traducción de proteínas de un gen específico; en este caso, la de los genes TNFRSF11B y NCF4.

- 30 Por lo tanto, el Experimento 2 se llevó a cabo con los siguientes grupos: lentivirus + silenciador génico TNFRSF11B-ARNip, lentivirus + silenciador génico NCF4-ARNip, control total (sin vehículo y sin fármaco), lentivirus + silenciador génico SM22aARNip + gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (control de vehículo 1), lentivirus + silenciador génico MYH11-ARNip + GAPDH (control de vehículo 2), sirolimus (control de fármaco 1) y paclitaxel (control de fármaco 2).

- 35 TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip son silenciadores génicos de los genes TNFRSF11B y NCF4, respectivamente. El sistema de entrega de silenciadores génicos se desarrolló mediante la inserción de los silenciadores génicos respectivos en un plásmido que es transportado por un lentivirus. Las partículas de lentivirus son virus intracelulares listos para la transducción que contienen plásmidos con silenciadores de genes. Después de la transducción, las células expresan permanentemente silenciadores de genes. La densidad de cultivos celulares 24 horas antes de la transfección fue de 2×10^5 células/10 cm² en medio de cultivo. Como resultado, se tomaron alícuotas de 5 µl de 10-1000 µM de ARNip en 100 µl/ml de cultivo de transfección.

- 40 Se usaron dos grupos de control que contenían un lentivirus y un silenciador génico de proteína de músculo liso 22a (SM22a) o cadena pesada de miosina de músculo liso (MYH11) para evaluar el vehículo. Se eligieron dichos dos genes porque se caracterizan como marcadores de la presencia de CMLV diferenciadas (maduras), es decir, se identifican únicamente en CMLV en la etapa final de diferenciación, considerándose dichas células como quiescentes. Por tanto, no existe en la literatura asociación entre estos 2 genes y los mecanismos de modulación de la proliferación de CMLV, ni tampoco son marcadores de CMLV jóvenes. Así, dichos dos silenciadores génicos, SM22a-ARNip y MYH11-ARNip, se marcaron con gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), denominados bioconjugados, para asegurar mediante microscopía de fluorescencia que los silenciadores génicos entraban efectivamente en CMLV y CE. Además, estos dos controles de vehículos se usaron para mostrar que el vehículo no interfiere con los procesos de proliferación de CMLV y CE. Las dosis de SM22a-ARNip y MYH11-ARNip también fueron similares a las de los silenciadores génicos anteriores, es decir, se tomaron alícuotas de 5 µl de 10 - 1000 µM de ARNip en 100 µl/ml de medio de transfección.

- 45 Los dos grupos de control de drogas consistieron en sirolimus y paclitaxel, respectivamente. Sirolimus y paclitaxel se prepararon en soluciones madre con etanol (20 mg/dl) y se diluyeron en medio de cultivo en soluciones de trabajo que oscilaron entre 10 y 1000 microgramos/ml. Dichos dos fármacos pertenecen a las dos únicas clases de fármacos con eficacia demostrada de inhibición de CMLV en la práctica clínica mediante SLF que también inhiben significativamente la proliferación de CE, teniendo efectos negativos sobre la reendotelización del stent.

- 60 En el grupo de control completo, las CMLV se cultivaron en medio de crecimiento de células de músculo liso (Gibco, medio 231) mientras que las CE se cultivaron en medio de células endoteliales (Gibco, medio 200). Ambos fueron

suplementados con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Invitrogen, Calsbad, CA, EE. UU.), estreptomisina (100 µg/ml) y penicilina (100 U/ml). Por tanto, no se utilizó ni vehículo ni fármaco.

Los resultados de los frascos que contienen CMLV humana se muestran en la Figura 1.

Los datos del cultivo de CMLV no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular de los grupos TNFRSF11B-ARNip, NCF4-ARNip y SM22a-ARNip en comparación con el grupo de control completo. También hubo una inhibición estadísticamente significativa en la proliferación celular de los grupos sirolimus, paclitaxel y MYH11-ARNip en relación con el grupo de control completo, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos 3 grupos. Ya se esperaba la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de sirolimus y paclitaxel y el grupo de control completo, así como la falta de diferencia significativa entre el grupo de SM22a-ARNip y el grupo de control completo. Sin embargo, el MYH11-ARNip promovió una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación de CMLV, es decir, el silenciamiento de un gen expresado solo en CMLV maduras/diferenciadas interfirió con la proliferación de CMLV jóvenes, inhibiendo significativamente su proliferación con una magnitud similar a la de sirolimus y paclitaxel.

Los resultados de los frascos que contienen CE vascular humana se muestran en la Figura 2. En cuanto a los datos del cultivo CE, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular de los grupos TNFRSF11B-ARNip, NCF4-ARNip, SM22a-ARNip y MYH11-ARNip en relación con el grupo de control completo. También hubo una inhibición estadísticamente significativa en la proliferación celular entre los grupos de sirolimus y paclitaxel y el grupo de control completo. La falta de diferencia estadística en los grupos TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip ya era esperable ya que el objetivo de estas dianas terapéuticas era no interferir o interferir lo menos posible con la proliferación de CE. La falta de la diferencia significativa entre los grupos SM22a-ARNip y MYH11-ARNip ya se esperaba porque estos dos silenciadores génicos se eligieron como control ya que supuestamente no interfieren con la proliferación de células CMLV y CE según los datos disponibles en la literatura. La inhibición significativa de la CE en los grupos de sirolimus y paclitaxel ya es bien conocida y se describe en la literatura, como se discutió anteriormente cuando se trató el problema de la trombosis del stent.

El ARNip de MYH11 inhibió significativamente la proliferación de CMLV en comparación con el control completo. Aunque MYH11-ARNip inhibía las CMLV humanas numéricamente más que sirolimus y paclitaxel, no hubo diferencias significativas entre estos 3 grupos. La inhibición de MYH11-ARNip de la CE vascular humana fue comparable al control total y extremadamente inferior a la de sirolimus y paclitaxel.

El TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip no lograron inhibir significativamente la proliferación de CMLV en comparación con el control completo.

Experimento 3

En el Experimento 2, los 2 silenciadores génicos identificados en el Experimento 1, TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip, no mostraron los beneficios esperados, mientras que uno de los dos silenciadores génicos utilizados como control del vehículo de lentivirus, MYH11-ARNip, mostró lo que era esperado de TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip, es decir, inhibición significativa de la proliferación de CMLV e inhibición no significativa de la proliferación de CE.

Por lo tanto, aunque la probabilidad de error al identificar los frascos o reemplazar los silenciadores génicos durante la preparación de las suspensiones fue baja debido al trabajo cuidadoso y la experiencia del equipo, se decidió repetir parcialmente el Experimento 2 para confirmar los resultados obtenidos en relación con el MYH11-ARNip.

Por lo tanto, el Experimento 3 constaba de los siguientes grupos: lentivirus + silenciador génico MYH11-ARNip, lentivirus + silenciador génico TNFRSF11B-ARNip, y lentivirus + silenciador génico NCF4-ARNip

Los resultados de los frascos que contenían CMLV humana y CE vascular humana se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

El análisis de los resultados de los frascos que contenían CMLV humana y CE vascular humana mostró resultados similares a los obtenidos en el Experimento 2, lo que confirma los resultados obtenidos anteriormente y los efectos inesperados y sorprendentes del MYH11-ARNip en la inhibición de la proliferación de CMLV sin una inhibición significativa de la proliferación de CE.

Experimento 4

Después de identificar y confirmar los resultados prometedores que surgen del silenciador génico MYH11-ARNip, nuestra siguiente etapa fue evaluar un posible efecto de clase de este fármaco, es decir, si los resultados prometedores obtenidos con el silenciador génico MYH11-ARNip pueden extenderse a otros silenciadores génicos de proteínas estructurales y funcionales de VMSC. Para ello, se llevó a cabo el Experimento 4 en medio de cultivo CMLV humano formado por los siguientes grupos: lentivirus + silenciador génico miosina de cadena pesada 11 (MYH11-ARNip), lentivirus + silenciador génico miosina de cadena ligera 9 (MYL9-ARNip), lentivirus + silenciador génico TRIO y

proteína de unión a actina F (TRIOBP-ARNip), lentivirus + silenciador génico calponina 1 (CNN1-ARNip), lentivirus + silenciador génico miosina quinasa de cadena ligera (MYLK-ARNip), lentivirus + silenciador génico miosina fosfatasa Rho que interactúa con proteína (MPRIP-ARNip), y control completo (sin vehículo y sin silenciador génico).

- 5 Los MYH11-ARNip, MYL9-ARNip, TRIOBP-ARNip y CNN1-ARNip son silenciadores génicos dirigidos a proteínas estructurales de CMLV, mientras que MYLK-ARNip y MPRIP-ARNip son silenciadores génicos dirigidos a proteínas funcionales de CMLV.

10 Las dosis de MYH11-ARNip, MYL9-ARNip, TRIOBP-ARNip, CNN1-ARNip, MYLK-ARNip y MPRIP-ARNip fueron alícuotas de 5 µl de 10 - 1000 µM de ARNip en 100 µl/ml de medio de transfección.

Los resultados de los frascos que contienen CMLV humana se muestran en la Fig. 5. MYH11-ARNip y CNN1-ARNip fueron los únicos entre seis silenciadores génicos específicos de proteínas estructurales y funcionales estudiados para inhibir significativamente la proliferación de CMLV.

15 Los silenciadores de los genes MYH11-ARNip y CNN1-ARNip probablemente ejerzan alguna actividad bloqueadora ligada exclusivamente a los genes MYH11 y CNN1. Es irrefutable que, de acuerdo con los resultados del Experimento 4, MYH11-ARNip y CNN1-ARNip son los únicos silenciadores génicos capaces de inhibir significativamente la proliferación de CMLV sin interferir con la proliferación de CE. Por lo tanto, esta actividad de bloqueo no se debe a un efecto de clase ya que el silenciamiento de varios otros genes relacionados con proteínas estructurales y funcionales de CMLV no proporciona la misma inhibición significativa de la proliferación de CMLV.

20 Por lo tanto, tanto MYH11-ARNip como CNN1-ARNip ejercen, independientemente uno del otro, actividad de bloqueo sobre una o más proteínas con una función clave en la formación e hiperproliferación de CMLV joven. La proliferación exacerbada y desorganizada de CMLV joven en la capa media de los vasos arteriales, seguida de su migración a través de las mallas estructurales metálicas del stent o las mallas estructurales del AVB hacia el lumen del vaso, puede conducir a la obstrucción del stent o del AVB, lo que se denomina ISR cuando es superior al 50 %.

Experimento 5

30 El uso de lentivirus y plásmidos para la transfección de silenciadores génicos es difícil de aplicar a la fabricación de SLF, AVB, BLF y otros dispositivos que a menudo se esterilizan mediante procesos que implican altas temperaturas, como el óxido de etileno (OET). Por lo tanto, en este experimento, se probó otro método basado en nanopartículas para llevar silenciadores génicos a las células de la pared vascular.

35 El Experimento 5 se llevó a cabo utilizando nanopartículas de 1, 2 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-Nmetxi (polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG) como vehículo portador de silenciador génico y fármacos en lugar de lentivirus y plásmidos que se utilizaron en los experimentos anteriores. Siendo así, se incluyeron 8 grupos tanto para la evaluación de nanopartículas como vehículo como para la confirmación final de los resultados anteriores: control (solo nanopartículas), MYH11-ARNip en nanopartículas, CNN1-ARNip en nanopartículas, sirolimus en nanopartículas, paclitaxel en nanopartículas, TNFRSF11B-ARNip en nanopartículas, NCF4-ARNip en nanopartículas y MYL9-ARNip GAPDH en nanopartículas.

40 Los grupos de sirolimus en nanopartículas y paclitaxel en nanopartículas se incluyeron para comparar la eficacia en la inhibición de la proliferación de CMLV. Los grupos de TNFRSF11B-ARNip en nanopartículas y NCF4-ARNip en nanopartículas se probaron nuevamente con un vehículo diferente para la confirmación final de los resultados negativos. Se estudió el grupo de MYL9-ARNip+GAPDH en nanopartículas para evaluar la eficacia del vehículo, es decir, para asegurar que los silenciadores génicos entrarían en CMLV y CE usando nanopartículas como vehículo. El silenciador génico MYL9-ARNip se eligió como control del silenciador génico porque no tiene ningún efecto inhibitorio sobre la proliferación de CMLV y CE de acuerdo con los datos obtenidos en el Experimento 4. El silenciador génico MYL9-ARNip se marcó con GAPDH para la posterior verificación de su transfección en las células mediante microscopía de fluorescencia. Finalmente, como vehículo de control se utilizaron nanopartículas puras, es decir, sin fármaco ni silenciador génico.

50 Las nanopartículas con sirolimus y paclitaxel se prepararon con DSPE-PEG-NH2 (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[amino(polietilenglicol)]-2000). Tanto el sirolimus como el paclitaxel se solubilizaron en 1 ml de acetona (fase orgánica) junto con el polímero PLGA. La fase acuosa consistió en DSPE-PEG-NH2 solubilizado en 10 ml de agua Milli Q, bajo agitación y a una temperatura del baño de 40 °C. Luego se inyectó la fase orgánica a la fase acuosa mediante una aguja de 20G, manteniéndose la suspensión bajo agitación moderada durante 5 minutos y luego se concentró a un volumen final de 10 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el solvente orgánico y ajustar la concentración final del fármaco. Se probaron concentraciones de sirolimus y paclitaxel que oscilaban entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

60 Las nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros cargadas con silenciadores génicos (ARNip) se prepararon mediante el método de nanoprecipitación. La fase acuosa consistió en el silenciador génico solubilizado en 10 ml de agua Milli Q en agitación y a una temperatura del baño de 30 °C. La fase orgánica que contenía un compuesto catiónico

lipídico DSPE-PEG-NH2 (1, 2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenglicol)-2000] y el polímero PLGA se inyectaron luego en la fase acuosa utilizando un 20G aguja, manteniéndose la suspensión en agitación moderada durante 5 minutos y luego concentrándose a un volumen final de 10 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente orgánico y ajustar la concentración final. Se probaron concentraciones de silenciador génico que oscilaban entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

Los resultados de los frascos que contienen CMLV humana se muestran en la Fig. 6. Hubo una inhibición significativa de la proliferación de CMLV por los silenciadores génicos MYH11 ARNip y CNN1-ARNip, así como por los fármacos antiproliferativos sirolimus y paclitaxel en comparación con el control, y no hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos (dos silenciadores génicos y dos fármacos antiproliferativos). Los silenciadores génicos TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip no mostraron diferencias significativas en la inhibición de la proliferación de CMLV en comparación con el control. El conjunto de resultados obtenidos en este experimento respalda los resultados anteriores de los experimentos anteriores sin precedentes que demostraron la ineficacia de los silenciadores génicos TNFRSF11B-ARNip y NCF4-ARNip para inhibir la hiperproliferación de CMLV, pero revelaron que los silenciadores génicos MYH11-ARNip y CNN1-ARNip ser eficaces en la inhibición de la hiperproliferación de CMLV. Ya se esperaba la falta de una diferencia significativa en la inhibición de la proliferación de CMLV por el silenciador génico MYL9-ARNip en comparación con el control, ya que dicho silenciador génico se utilizó como control del silenciador génico; sin embargo, cuando el MYL9-ARNip se marcó con GAPDH y las CMLV de este grupo se verificaron mediante microscopía de fluorescencia, se encontró que las nanopartículas entraron efectivamente en las CMLV.

Los resultados de los frascos que contenían células endoteliales vasculares humanas se muestran en la Figura 7.

Los resultados del cultivo de CE humano también fueron similares a los de los experimentos anteriores. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de CE entre los silenciadores génicos MYH11-ARNip, TNFRSF11B-ARNip, NCF4-ARNip y MYL9-ARNip y el grupo de control. Sirolimus y paclitaxel determinaron, como ya se esperaba, una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación de CE en comparación con el grupo de control y todos los silenciadores génicos probados.

Experimento 6

El Experimento 6 fue un estudio in vivo en cerdos que comparó el stent liberador de ARNip de MYH11 y el stent liberador de ARNip de CNN1 con el stent de metal sin recubrimiento y el stent liberador de sirolimus.

Se cubrieron dieciocho stents metálicos desnudos de 2.75 x 15 mm disponibles en el mercado con MYH11-ARNip en nanopartículas (9 stents) o CNN1-ARNip en nanopartículas (9 stents) utilizando una máquina con boquilla rociadora para crear una cubierta abluminal con el fin de administrar los silenciadores génicos localmente en la superficie interior del vaso.

Las nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros cargadas con silenciadores génicos (ARNip) se prepararon mediante el método de nanoprecipitación. La fase acuosa consistió en el silenciador génico solubilizado en 10 ml de agua Milli Q en agitación y a una temperatura del baño de 30 °C. A continuación, se inyectó en la fase acuosa la fase orgánica que contenía un compuesto catiónico lipídico DSPE-PEG-NH2 (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] y el polímero PLGA utilizando una aguja de 20G, se mantuvo la suspensión en agitación moderada durante 5 minutos y luego se concentró a un volumen final de 10 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el solvente orgánico y ajustar la concentración final. Se analizaron concentraciones de MYH11-ARNip y CNN1-ARNip que oscilaban entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

Después de cubrir la superficie abluminal de los 18 stents con MYH11-ARNip en nanopartículas (9 stents) o CNN1-ARNip en nanopartículas (9 stents), los stents se dejaron secar durante 60 minutos, envasados en DuPont Tyvek™ y luego esterilizado con óxido de etileno (EtO) a 50 °C.

Nueve cerdos Large White fueron sometidos al despliegue de stents en las arterias coronarias, siendo 1 stent desplegado en la descendente anterior izquierda (DAI), 2 stents en la circunfleja (CX) y 1 stent en la arteria coronaria derecha (ACD). Los stents fueron desplegados en una relación de diámetro de 1.1 en relación al diámetro de la arteria coronaria, es decir, con un leve sobredimensionamiento, con el fin de estimular una reacción inflamatoria similar a la que provoca la reestenosis intra-stent, para evaluar la eficacia de los silenciadores génicos en controlar la hiperplasia neointimal en el stent en un modelo in vivo. Este protocolo de despliegue de stent sobredimensionado fue previamente validado (Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, et al. The porcine coronary model of in-stent restenosis: Current status in the era of drug-eluting stents. Catheter Cardiovasc Interv. 2003;60:515-23.)

El tiempo prolongado de reendotelización del stent es el punto crítico de los stents liberadores de fármacos disponibles comercialmente en la actualidad. Así sirolimus y análogos como paclitaxel disminuyen la proliferación de células del músculo liso vascular previniendo la hiperplasia neointimal intra-stent, así como suprimen la proliferación de células endoteliales prolongando el tiempo de re-endotelización del stent. A diferencia del sirolimus y sus análogos y del paclitaxel, los silenciadores génicos tienen una acción selectiva sobre la disminución de la proliferación de las células del músculo liso sin interferir con la proliferación de las células endoteliales. Por lo tanto, para evaluar el tiempo de

reendotelización del stent, se programó un seguimiento angiográfico y ecográfico intravascular a los 30, 90 y 180 días después del despliegue del stent.

El análisis de ultrasonido intravascular se realizó trazando 31 marcos para cada stent con 0.5 mm de separación entre cada marco desde el borde distal del stent hasta el borde proximal del stent. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Bonferroni.

Los datos del ultrasonido intravascular en el procedimiento índice, así como los resultados de la proliferación neointimal intrastent a los 30, 90 y 180 días del despliegue del stent se muestran en la tabla 1, mientras que los datos comparativos del ultrasonido intravascular con respecto a la reendotelización del stent a los 30, 90 y 180 días después del despliegue del stent se muestran en la tabla 2.

Tabla 1: Datos comparativos de ultrasonido intravascular al inicio y a los 30, 90 y 180 días después de la colocación del stent en cerdos.

	Metal sin recubrimiento	Sirolimus	MYH11-ARNip	CNN1-ARNip	p
RD	2.74 ± 0.08 mm	2.73 ± 0.08 mm	2.72 ± 0.09 mm	2.73 ± 0.08 mm	p = 0.9495
MLD					
Antes del stent	2.74 ± 0.08 mm	2.73 ± 0.08 mm	2.72 ± 0.09 mm	2.73 ± 0.08 mm	p = 0.9495
Después de stent	3.02 ± 0.09 mm	3.01 ± 0.10 mm	3.00 ± 0.12 mm	3.00 ± 0.11 mm	p = 9603
Seguimiento	2.11 ± 0.12 mm*	2.68 ± 0.13 mm	2.70 ± 0.14 mm	2.73 ± 0.13 mm	p < 0.0001
LLL	0.91 ± 0.11 mm*	0.33 ± 0.12 mm	0.30 ± 0.14 mm	0.28 ± 0.11 mm	p < 0.0001
ALM					
Después de stent	7.08 ± 0.06 mm ²	7.06 ± 0.07 mm ²	7.06 ± 0.06 mm ²	7.07 ± 0.07 mm ²	p = 0.8546
Seguimiento	4.67 ± 0.23 mm ² a	6.21 ± 0.16 mm ² b	6.35 ± 0.14 mm ² be	6.43 ± 0.13 mm ² c	p < 0.0001 (a,b) p = 0.03 (b,c)
Obstrucción					p < 0.0001
30 días	32.3 ± 2.4 %*	11.4 ± 2.2 %	10.5 ± 2.8 %	9.6 ± 2.3 %	p < 0.0001
90 días	33.4 ± 2.2 %*	12.3 ± 2.1 %	11.4 ± 2.7 %	10.4 ± 2.5 %	p < 0.0001 (a,b)
180 días	35.1 ± 2.8 % a	13.8 ± 2.4 % b	12.4 ± 2.1 % be	10.9 ± 2.6 % c	p = 0.012 (b,c)
- RD: diámetro de referencia del vaso; MLD: diámetro luminal mínimo; LLL: pérdida tardía de luz; ALM: área luminal mínima; obstrucción: promedio de obstrucción porcentual en toda la longitud del stent; *: p significativo; letras a,b,c: diferentes valores de p.					

Los tres stents liberadores de fármacos, es decir, el stent liberador de sirolimus, el stent liberador de MYH11-ARNip y el stent liberador de CNN1-ARNip, mostraron un área luminal mínima más alta y una obstrucción más baja a los 30, 90 y 180 días en comparación con el stent de metal sin recubrimiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el stent liberador de sirolimus, el stent liberador de MYH11-ARNip y el stent liberador de CNN1-ARNip.

Los hallazgos anteriores muestran que tanto el stent liberador de MYH11-ARNip como el stent liberador de CNN1-ARNip son superiores al stent de metal sin recubrimiento y tan efectivos como el stent liberador de sirolimus para promover la inhibición de la hiperplasia neointimal dentro del stent. Por lo tanto, los silenciadores génicos MYH11-ARNip y CNN1-ARNip pueden suprimir la proliferación de CMLV y, en consecuencia, la hiperplasia neointimal en el stent a través de un mecanismo de acción novedoso al bloquear la expresión de genes específicos y fundamentales involucrados en la proliferación de CMLV, que es completamente diferente al mecanismo de acción de los fármacos antiproliferativos celulares, como el sirolimus y sus análogos y el paclitaxel, que actúan en los puntos de control del ciclo celular. Por lo tanto, sirolimus y sus análogos actúan en la fase G1-S del ciclo celular mientras que paclitaxel actúa en la fase G2-M del ciclo celular, ambos grupos de fármacos detienen el ciclo celular de cualquier tipo de célula (incluyendo CMLV y CE) e inhibiendo la división celular y la proliferación celular posterior.

Los datos sobre la reendotelización del stent en la tabla 2 muestran resultados importantes.

Tabla 2: Datos comparativos con respecto a la reendotelización del ultrasonido intravascular a los 30, 90 y 180 días después del despliegue del stent en cerdos.

	Metal sin recubrimiento	Sirolimus	MYH11-ARNip	CNN1-ARNip	p
30 días	98 ± 3.1 %	48 ± 3.3 %*	97 ± 3.1 %	98 ± 3.0 %	p < 0.0001
90 días	100 ± 2.9 %	89 ± 3.8 %*	100 ± 2.8 %	100 ± 2.7 %	p < 0.001
180 días	100 %	100 %	100 %	100 %	-

A los 30 días, el análisis de ultrasonido intravascular reveló un porcentaje similar de cobertura de las mallas estructurales del stent en los 31 marcos de stent analizados por stent en los grupos de stent de metal sin recubrimiento, stent liberador de MYH11-ARNip y stent liberador de CNN1-ARNip, mientras que los grupos de stent liberador de sirolimus mostró una diferencia estadísticamente significativa de la cobertura de las mallas estructurales del stent en comparación con los grupos de stent de metal sin recubrimiento, stent liberador de MYH11-ARNip y stent liberador de CNN1-ARNip.

Los resultados del ultrasonido intravascular a los 90 días mostraron una cobertura completa de la malla estructural del stent en los grupos de stent de metal sin recubrimiento, stent liberador de ARNip-MYH11 y stent liberador de CNN1-ARNip, mientras que el grupo de stent liberador de sirolimus evidenció solo una cobertura parcial de la malla estructural del stent con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos de stent de metal sin recubrimiento, stent liberador de MYH11-ARNip y stent liberador de CNN1-ARNip.

A los 180 días, los resultados del ultrasonido intravascular evidenciaron una cobertura completa de las mallas estructurales del stent en los 4 grupos.

El tiempo de cobertura total de la malla estructural del stent es el desafío actual con respecto a los stents liberadores de fármacos porque la cobertura de la malla estructural del stent está directamente relacionada con la trombosis del stent y, en consecuencia, con la duración de la terapia antiplaquetaria dual. Por lo tanto, se requiere un stent liberador de fármacos que inhiba la CMLV y la hiperplasia neointimal como el stent liberador de sirolimus y que también promueva la reendotelización rápida como un stent de metal sin recubrimiento. El Experimento 6 mostró que tanto el stent liberador de MYH11-ARNip como el stent liberador de CNN1-ARNip fueron capaces de promover la inhibición sostenida de la hiperplasia interna del stent como stent liberador de sirolimus, pero también permitieron una reendotelización rápida como un stent de metal sin recubrimiento por medio de un novedoso mecanismo de acción nunca antes descrito en la literatura médica.

Experimento 7

En el Experimento 7, evaluamos otros 32 silenciadores génicos relacionados con proteínas estructurales y funcionales de CMLV humana que no se habían probado previamente ni mencionado en los experimentos anteriores.

Los silenciadores génicos se prepararon en nanopartículas de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-metoxi(polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG) como vehículo para los silenciadores génicos utilizando el mismo método que en el Experimento 5.

Se usaron cuatro grupos (1) control (solo nanopartículas), (2) sirolimus en nanopartículas, (3) MYH11-ARNip en nanopartículas y (4) CNN1-ARNip en nanopartículas para comparar la eficacia en la inhibición de la proliferación de CMLV.

Las nanopartículas con sirolimus se prepararon con DSPE-PEG-NH₂ (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000]. Sirolimus se solubilizó en 1 ml de acetona (fase orgánica) junto con el polímero PLGA. La fase acuosa consistió en DSPE-PEG-NH₂ solubilizado en 10 ml de agua Milli Q, bajo agitación y a una temperatura del baño de 40 °C. A continuación, la fase orgánica se inyectó a la fase acuosa mediante una aguja de 20G, se mantuvo la suspensión en agitación moderada durante 5 minutos y luego se concentró a un volumen final de 10 ml en un rotavapor para eliminar el disolvente orgánico y ajustar la concentración final del fármaco. Se ensayó una concentración de sirolimus que oscilaba entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

Las nanopartículas híbridas de lípidos y polímeros cargados con silenciadores génicos (ARNip) se prepararon mediante el método de nanoprecipitación. La fase acuosa consistió en el silenciador génico solubilizado en 10 ml de agua Milli Q en agitación y a una temperatura del baño de 30 °C. A continuación, se inyectó en la fase acuosa la fase orgánica que contenía un compuesto catiónico lipídico DSPE-PEG-NH₂ (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] y el polímero PLGA utilizando una aguja de 20G, se mantuvo la suspensión en agitación moderada durante 5 minutos y luego se concentró a un volumen final de 10 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el solvente orgánico y ajustar la concentración final. Se probaron concentraciones de silenciador génico que oscilaban entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

La eficacia para inhibir significativamente la proliferación de CMLV humana se definió como $\leq 50\%$ de proliferación de CMLV humana en los frascos que contenían estas células específicas, mientras que un efecto no significativo sobre la inhibición de CE humana se definió como $\geq 90\%$ de proliferación de CE humana en los frascos que contienen CE humana.

Los resultados de los frascos que contenían CMLV humana revelaron que de los 32 silenciadores génicos adicionales probados solo 7 silenciadores de genes, es decir, leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmotelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip, promovieron una inhibición significativa de la proliferación de CMLV humana de acuerdo con los

criterios mencionados anteriormente, es decir, ≤ 50 % de proliferación humana de CMLV en los frascos que contienen estas células específicas, como se muestra en la Figura 8.

Los silenciadores génicos MYH11-ARNip y CNN1-ARNip fueron los inhibidores más potentes de las CMLV humanas, ya que fueron los únicos que promovieron una tasa de inhibición superior al 80 % (19 % y 18 % de la proliferación de CMLV humanas, respectivamente), similar al sirolimus (19 % de proliferación de CMLV humana). El LMOD-ARNip fue el único silenciador génico que promovió una tasa de inhibición de CMLV humana que oscilaba entre el 70 y el 80 % (el 25 % de la proliferación de CMLV humana), que estaba cerca pero no tan fuerte como sirolimus, MYH11-ARNip y CNN1-ARNip. A continuación, a una tasa de inhibición de CMLV humana que oscilaba entre el 60 y el 70 %, este experimento evidenció SMTN-ARNip, TPM-ARNip y CALD-ARNip, que mostraron una proliferación de CMLV humana del 38 %, 33 % y 32 %, respectivamente. Finalmente, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip demostraron una tasa de inhibición de CMLV humana que oscila entre 50 y 60 % a 41 %, 43 % y 46 % de proliferación de CMLV humana, respectivamente.

El conjunto de resultados obtenidos en este experimento respalda nuevamente los resultados anteriores de esta serie de experimentos sin precedentes que revelaron que los silenciadores génicos MYH11-ARNip y CNN1-ARNip son tan efectivos como sirolimus para inhibir la hiperproliferación de CMLV; además, también demostraron la eficacia de otros 7 silenciadores génicos (LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip) para inhibir significativamente la proliferación de CMLV humana. Por lo tanto, un total de 9 silenciadores génicos pudieron inhibir significativamente la hiperproliferación de CMLV humana; sin embargo, exhibieron diferente potencia o efectividad.

El Experimento 7 también evaluó el efecto de los 9 silenciadores génicos MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip, solo como nanopartículas (control) y sirolimus en la inhibición de la proliferación de CE en humanos. Los resultados de los frascos que contenían células endoteliales vasculares humanas se muestran en la Figura 9. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de CE entre los 9 silenciadores génicos (MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip) se probaron a sí mismos y se compararon con el grupo de control compuesto solo de nanopartículas (ni fármaco ni silenciador génico). Como ya se describió en la literatura y se observó en los experimentos anteriores, sirolimus determinó una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación de CE en comparación con el grupo de control y los 9 silenciadores génicos probados. Por lo tanto, los 9 silenciadores génicos que inhibieron eficazmente la proliferación de CMLV humana no interfirieron con la proliferación de CE humana, lo que los convierte en candidatos potenciales para un dispositivo médico que libera silenciadores de genes, ya que son capaces de controlar la proliferación de CMLV humana sin suprimir la proliferación de CE de humano lo que permite una reendotelización rápida de vasos y/o dispositivos médicos.

Experimento 8

Los 7 experimentos anteriores permitieron identificar 9 silenciadores génicos relacionados con proteínas estructurales y funcionales de CMLV humanas no estudiadas ni probadas previamente como agentes capaces de controlar la proliferación de CMLV humanas sin suprimir la proliferación de CE humanas. Estos experimentos también revelaron que dichos silenciadores de 9 genes tienen diferente potencia o eficacia en la inhibición de CMLV humana cuando se usan las mismas dosis.

Por lo tanto, con el objetivo de aclarar la relación entre la dosis del silenciador génico y la potencia/eficacia en la inhibición de CMLV humana, realizamos el Experimento 8 que evaluó 3 dosis diferentes de 5 silenciadores génicos probados en el Experimento 7. Siendo así, seleccionamos CNN1-ARNip y MYH11-ARNip que fueron los silenciadores génicos más efectivos; LMOD-ARNip que promovió un efecto inhibitorio sobre CMLV humano en un rango entre 70 y 80 %; SMTN-ARNip que causó un efecto inhibitorio sobre CMLV humano en un rango entre 60 y 70 % y ACTB-ARNip que mostró la respuesta más débil en la inhibición de CMLV humano entre los 9 silenciadores génicos considerados efectivos. Los 5 silenciadores génicos seleccionados se compararon solo con nanopartículas (control) y sirolimus.

En una realización, se probaron tres dosis crecientes diferentes de silenciadores de genes:

- a) Dosis estándar, 8 microlitros por pozo de la concentración estándar de solución silenciadora de genes;
- b) Dosis alta, 24 microlitros por pocillo de la concentración estándar de solución silenciadora de genes; y
- c) Dosis muy alta, 24 microlitros por pocillo de una solución silenciadora de genes con doble concentración en comparación con la solución silenciadora de genes estándar.

La solución estándar de silenciador génico se preparó utilizando la misma metodología de los experimentos anteriores, es decir, por el método de nanoprecipitación. La fase acuosa consistió en el silenciador génico solubilizado en 10 ml de agua Milli Q en agitación y a una temperatura del baño de 30 °C. La fase orgánica que contenía un compuesto catiónico lipídico DSPE-PEG-NH₂ (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenglicol)-2000] y el

polímero PLGA se inyectó luego en la fase acuosa utilizando una aguja de 20G, se mantuvo la suspensión en agitación moderada durante 5 minutos y luego se concentró a un volumen final de 10 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el solvente orgánico y ajustar la concentración final. Se probaron concentraciones de silenciador génico que oscilaban entre 10 µg/ml y 100 µg/ml.

5

La solución silenciadora de genes de doble concentración también se preparó utilizando el método de nanoprecipitación. La fase acuosa consistió en el silenciador génico solubilizado en 10 ml de agua Milli Q en agitación y a una temperatura del baño de 30 °C. La fase orgánica que contenía un compuesto catiónico lipídico DSPE-PEG-NH₂ (1, 2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenglicol)-2000] y el polímero PLGA se inyectó luego en la fase acuosa utilizando una aguja de 20G, se mantuvo la suspensión en agitación moderada durante 10 minutos y luego se concentró a un volumen final de 5 ml en un evaporador rotatorio para eliminar el solvente orgánico y ajustar la concentración final. Se probaron concentraciones de silenciador génico que oscilaban entre 20 µg/ml y 200 µg/ml.

10

15 Los resultados de los frascos que contenían células endoteliales vasculares humanas se muestran en la Figura 10.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las 3 dosis crecientes diferentes probadas para cada uno de los 5 silenciadores génicos evaluados. Por lo tanto, de manera similar al efecto de sirolimus sobre la proliferación de CMLV humana, los silenciadores génicos también tienen una amplia gama de dosis en las que el agente es eficaz y su eficacia no depende de la dosis. Siendo así, probablemente existe un umbral en este amplio rango de dosis en el que se alcanza el máximo efecto (dosis mínima eficaz). Además, una vez que se alcanza la dosis mínima efectiva, los receptores de CMLV se saturan, lo que hace que el efecto no sea dependiente de la dosis a partir de dicho umbral de dosis mínima efectiva.

20

25 Los 5 silenciadores génicos evaluados, así como el sirolimus, mostraron la misma magnitud de inhibición de CMLV humana en comparación con el grupo de control que en los experimentos anteriores de esta solicitud de patente. Por lo tanto, el Experimento 8 respalda la estabilidad del efecto de los silenciadores génicos en la inhibición de la proliferación de CMLV humana, así como la reproducibilidad de la metodología utilizada para los experimentos.

25

Además, con el objetivo de evaluar el efecto de las dosis crecientes de los silenciadores génicos en la CE humana, probamos 3 dosis crecientes diferentes de 5 silenciadores génicos CNN1-ARNip, MYH11-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip y ACTB-ARNip en comparación con nanopartículas únicamente (control) y sirolimus en frascos que contenían CE humana. Los resultados de los frascos que contenían células CE humanas se muestran en la Figura 11.

30

No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las 3 dosis crecientes diferentes probadas para cada uno de los 5 silenciadores génicos evaluados, así como tampoco ninguna de las 3 dosis crecientes diferentes probadas para cada uno de los 5 silenciadores génicos evaluados difería significativamente en comparación con el control. Como ya se esperaba, sirolimus mostró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control, así como con las 3 dosis crecientes diferentes probadas para cada uno de los 5 silenciadores génicos evaluados. Por lo tanto, incluso dosis altas o muy altas de silenciadores génicos no interfieren con la proliferación de CE humana.

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular, el dispositivo comprende:

a) un dispositivo médico de elución; y

b) al menos un silenciador génico (ARNip)

- en el que el dispositivo médico de elución está cubierto o relleno con al menos un silenciador génico;

- en el que el silenciador génico se selecciona de la cadena pesada de miosina 11 (MYH11)-ARNip, calponina 1 (CNN1)-ARNip, leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmotelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip;

- en el que el silenciador génico se administra localmente en el vaso sanguíneo para entrar en la pared del vaso y en las células del músculo liso vascular (CMLV) para la inhibición selectiva de la hiperproliferación de CMLV sin inhibir la proliferación de células endoteliales (CE).

2. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 1, en el que el dispositivo comprende un vehículo silenciador génico, facilitando dicho vehículo silenciador génico la elución del silenciador génico y permitiendo que el silenciador génico entre en la pared del vaso sanguíneo y CMLV.

3. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo médico de elución se selecciona de cualquier dispositivo implantable y dispositivo local no implantable de administración de fármacos.

4. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 3, en el que el dispositivo implantable se selecciona de un stent metálico y un armazón vascular bioabsorbible (AVB).

5. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 3, en el que dicho dispositivo de administración local de fármacos no implantable se selecciona de un balón liberador de fármacos (BLF), un catéter de administración local de fármacos y cualquier otro dispositivo médico capaz de administrar localmente MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip.

6. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 2, en el que dicho vehículo silenciador génico se elige de un grupo que consiste en lentivirus y plásmidos, nanopartículas, fluoropolímeros, polímeros bioabsorbibles, polímeros no absorbibles, o incluso puede estar libre de polímeros (sin ningún tipo de polímero).

7. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 1, en el que dicho silenciador génico se administra solo o en combinación con otro silenciador génico o con fármacos antiproliferativos celulares.

8. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 1, en el que la concentración del silenciador génico oscila entre 1 µg/ml y 1000 µg/ml, que es un rango de concentración amplio, ya que el silenciador génico se puede esparcir sobre la superficie del dispositivo médico a partir de una única capa muy fina hasta varias capas gruesas para alcanzar la cantidad deseada de silenciador génico que se administrará localmente.

9. El dispositivo como se reivindicó en la reivindicación 1, en el que el dispositivo promueve tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo como la reendotelización temprana de un segmento de vaso sanguíneo tratado.

10. Un dispositivo médico de elución para su uso en un método para promover la cobertura rápida de la malla estructural y la cobertura del endotelio vascular, el método comprende:

a) proporcionar un dispositivo médico de elución y al menos un silenciador génico;

b) recubrir o rellenar el dispositivo médico de elución con al menos un silenciador génico;

c) administrar el silenciador génico a un segmento diana de vaso sanguíneo; y

d) seleccionar el silenciador génico de los siguientes silenciadores génicos: cadena pesada de miosina 11 (MYH11)-ARNip, calponina 1 (CNN1)-ARNip, leiomodina 1 (LMOD)-ARNip, esmotelina (SMTN)-ARNip, tropomiosina (TPM)-ARNip, caldesmon 1 (CALD)-ARNip, actinina (ACTN)-ARNip, actina alfa (ACTA)-ARNip y actina beta (ACTB)-ARNip;

- en el que dicho silenciador génico se administra al segmento diana del vaso sanguíneo para entrar en la pared del vaso y CMLV para la inhibición selectiva de la hiperproliferación de CMLV;

- en el que dicho silenciador génico no interfiere significativamente con la producción de CE o incluso puede estimularla.

5 11. El dispositivo médico de elución para uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 10, en el que el método comprende además cargar dicho silenciador génico en un vehículo silenciador génico:

- en el que dicho vehículo silenciador génico facilita la elución del silenciador génico;

10 - en el que dicho vehículo silenciador génico permite que el silenciador génico entre en la pared del vaso sanguíneo diana y en la CMLV.

12. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 10, en el que el dispositivo médico de elución se selecciona de cualquier dispositivo implantable y dispositivo de administración local de fármacos no implantable.

15 13. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 12, en el que el dispositivo implantable se selecciona de un stent metálico y un armazón vascular bioabsorbible (AVB).

20 14. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 12, en el que dicho dispositivo de administración local de fármacos no implantable se selecciona de un globo de elución de fármacos (BLF), un catéter de administración local de fármacos y cualquier otro dispositivo médico capaz de administrar localmente MYH11-ARNip, CNN1-ARNip, LMOD-ARNip, SMTN-ARNip, TPM-ARNip, CALD-ARNip, ACTN-ARNip, ACTA-ARNip y ACTB-ARNip.

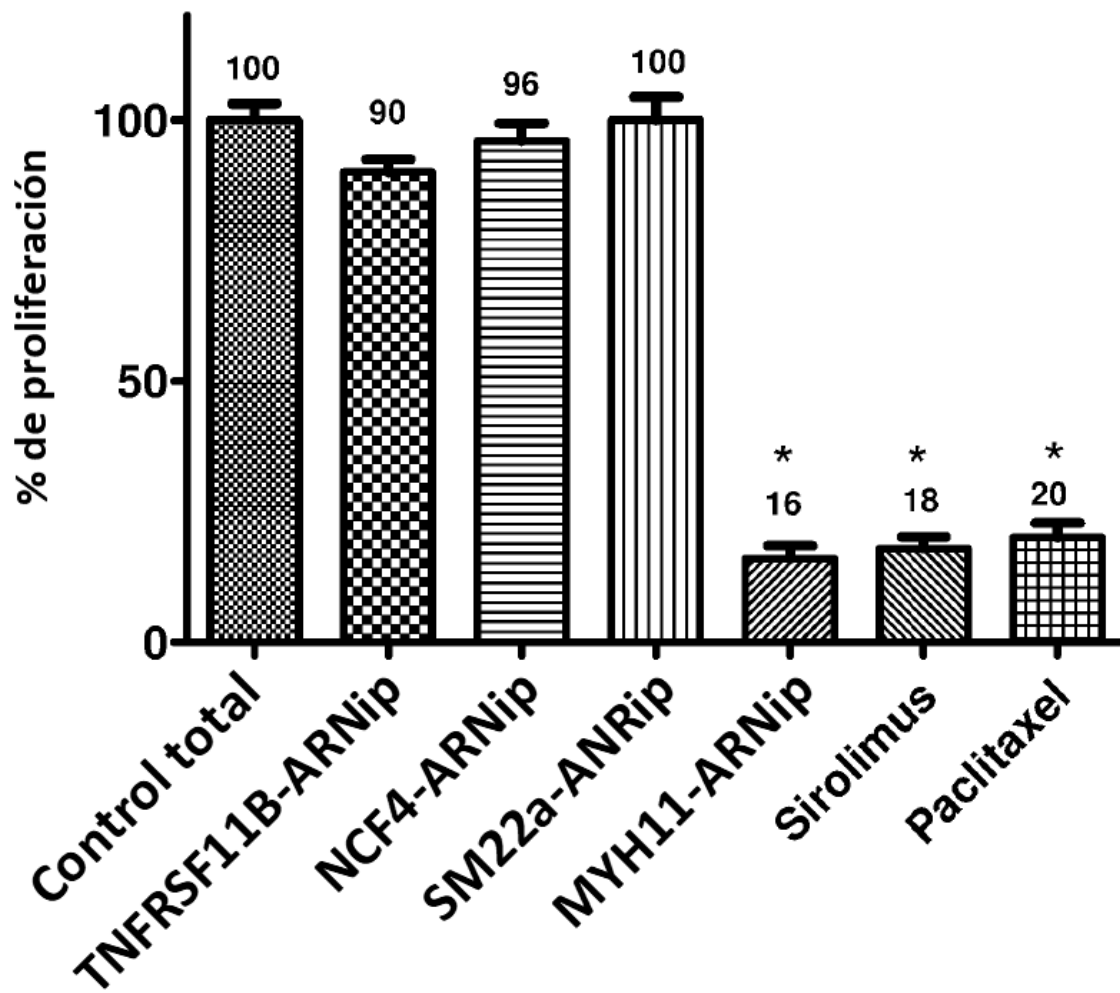
25 15. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 11, en el que dicho vehículo silenciador génico se elige de un grupo que consiste en lentivirus y plásmidos, nanopartículas, fluoropolímeros, polímeros bioabsorbibles, polímeros no absorbibles, o incluso puede estar libre de polímeros (sin ningún tipo de polímero).

30 16. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 10, en el que dicho silenciador génico se administra solo o en combinación con otro silenciador génico o con fármacos antiproliferativos celulares.

35 17. El dispositivo médico de elución para su uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 10, en el que la concentración del silenciador génico oscila entre 1 µg/ml y 1000 µg/ml, que es un amplio rango de concentración, ya que el silenciador génico se puede esparcir por la superficie del dispositivo médico desde una sola capa muy delgada hasta varias capas gruesas para alcanzar la cantidad deseada de silenciador génico que se administrará localmente.

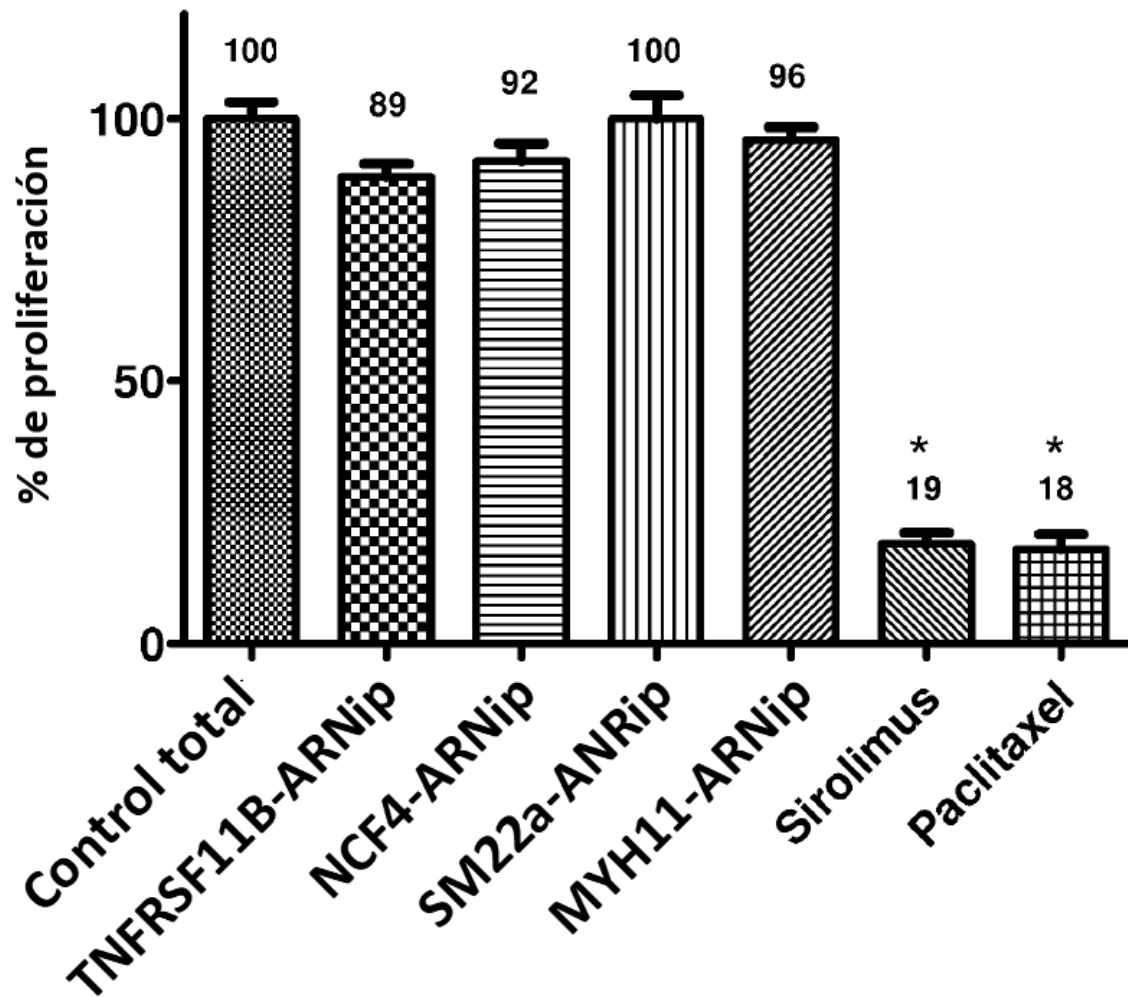
40 18. El dispositivo médico de elución para uso en el método como se reivindicó en la reivindicación 10, en el que el método promueve tanto la permeabilidad permanente del vaso sanguíneo como la reendotelización temprana de un segmento de vaso sanguíneo tratado.

Fig. 1



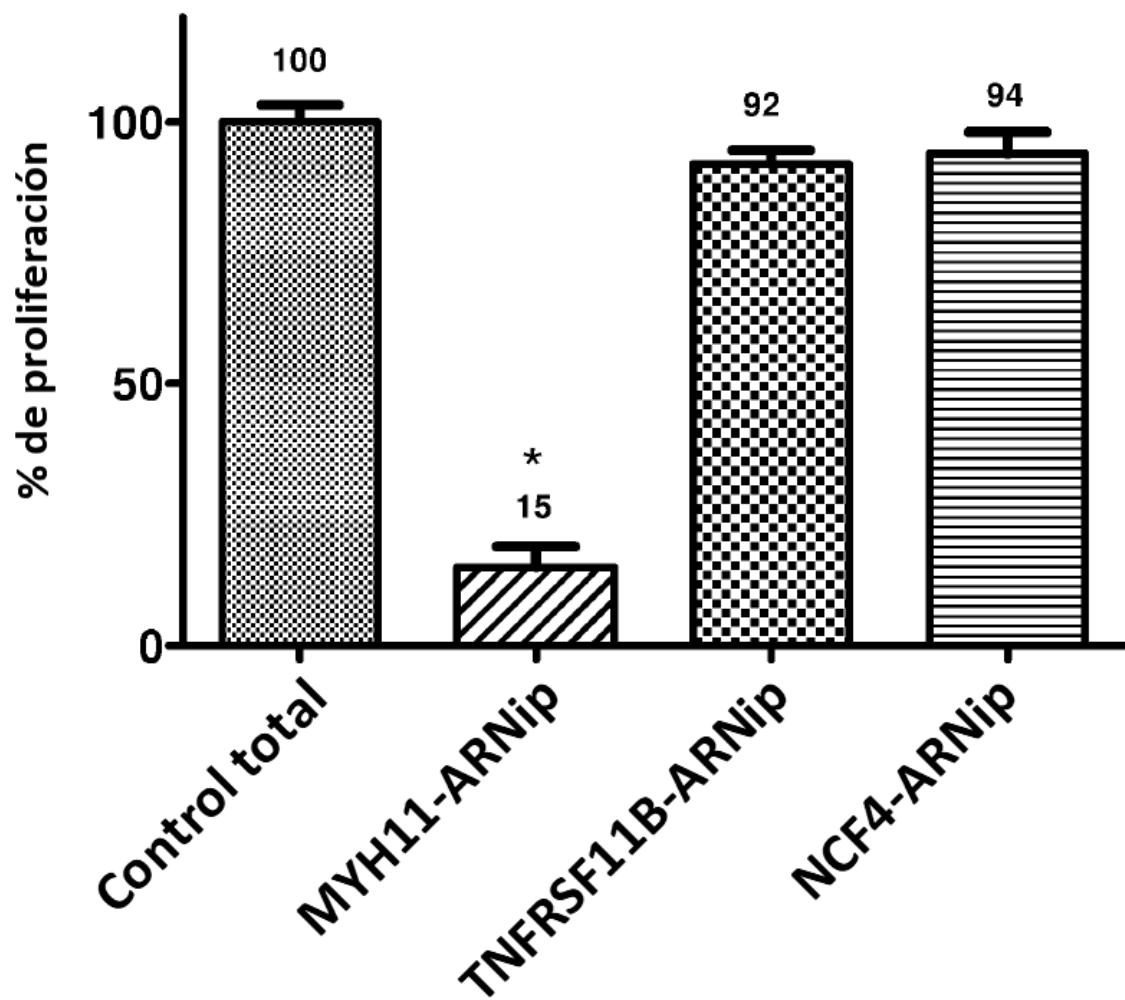
* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 2



* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 3



* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 4

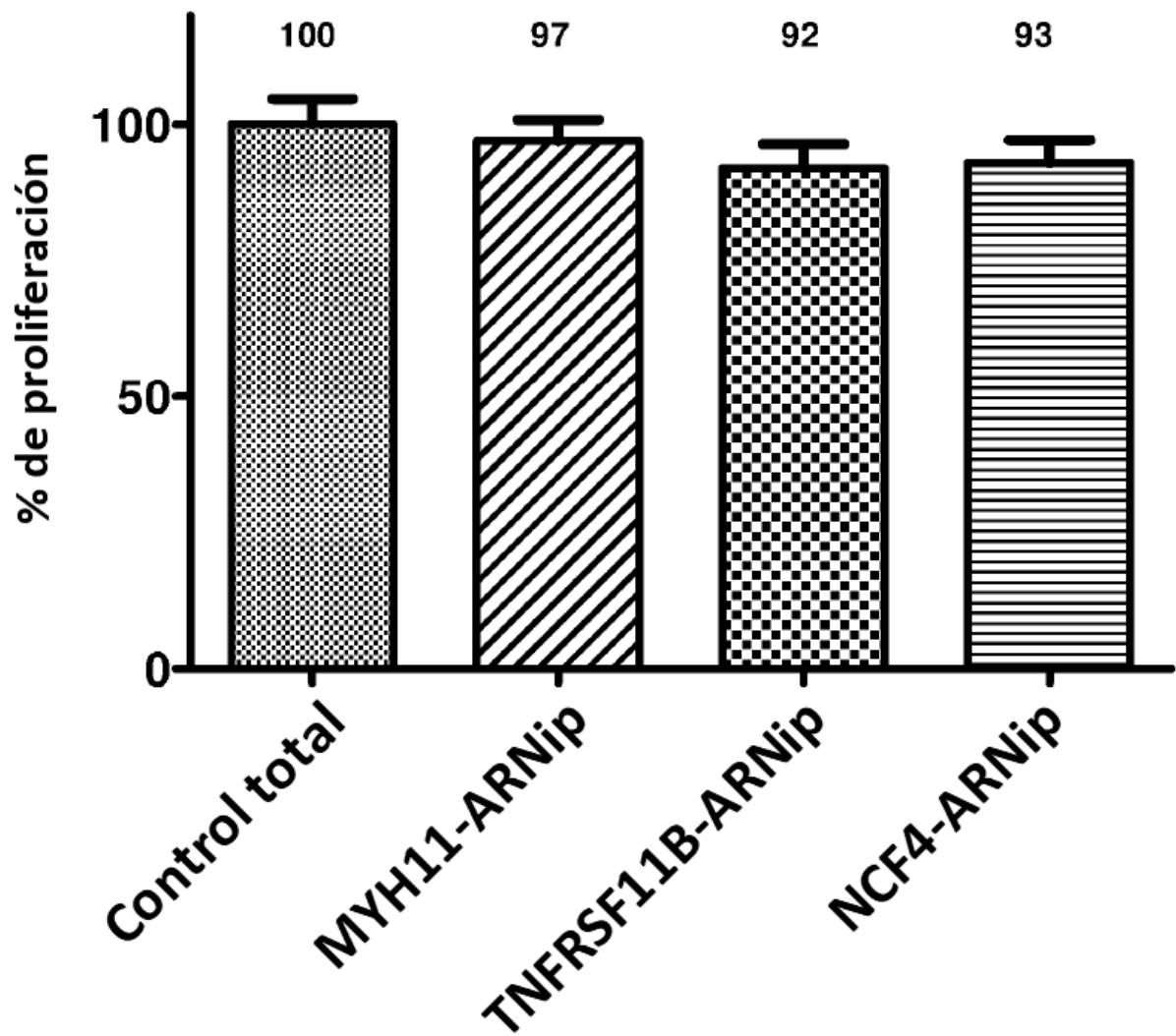
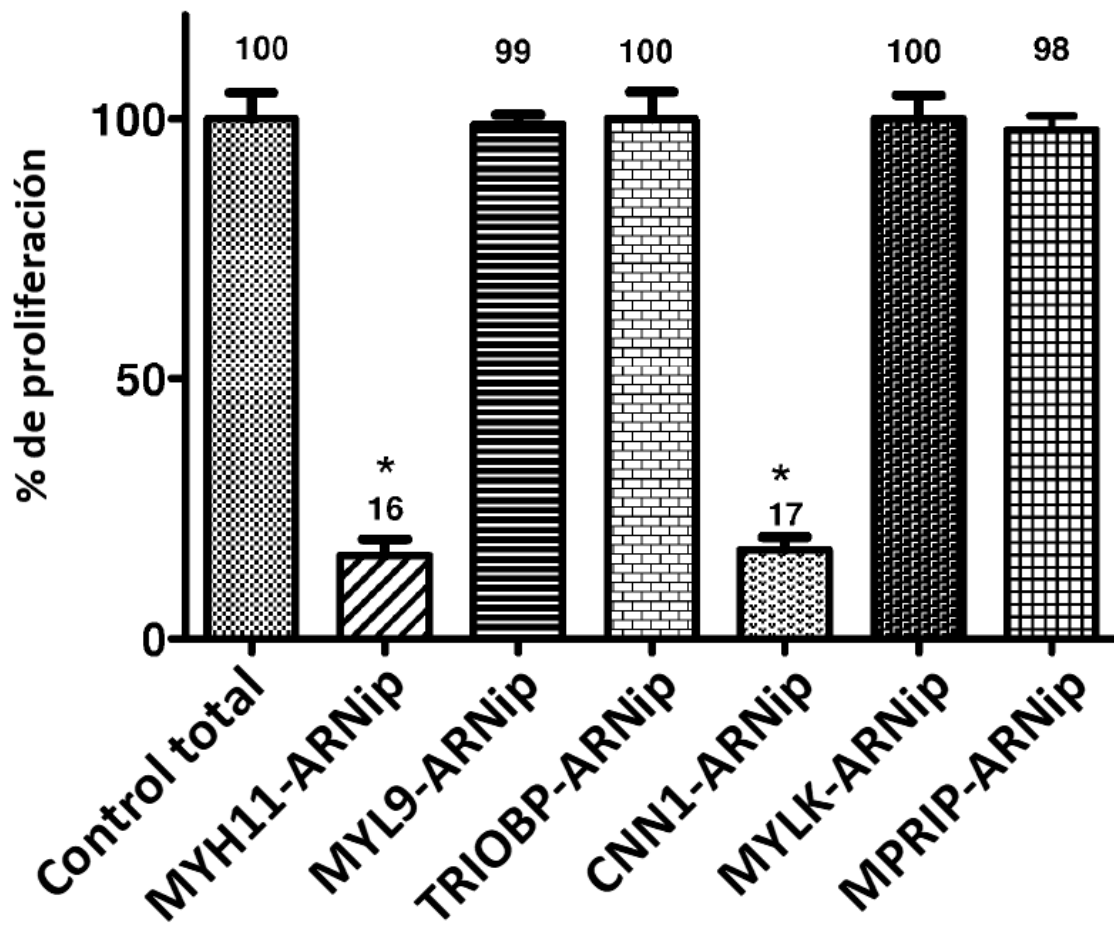
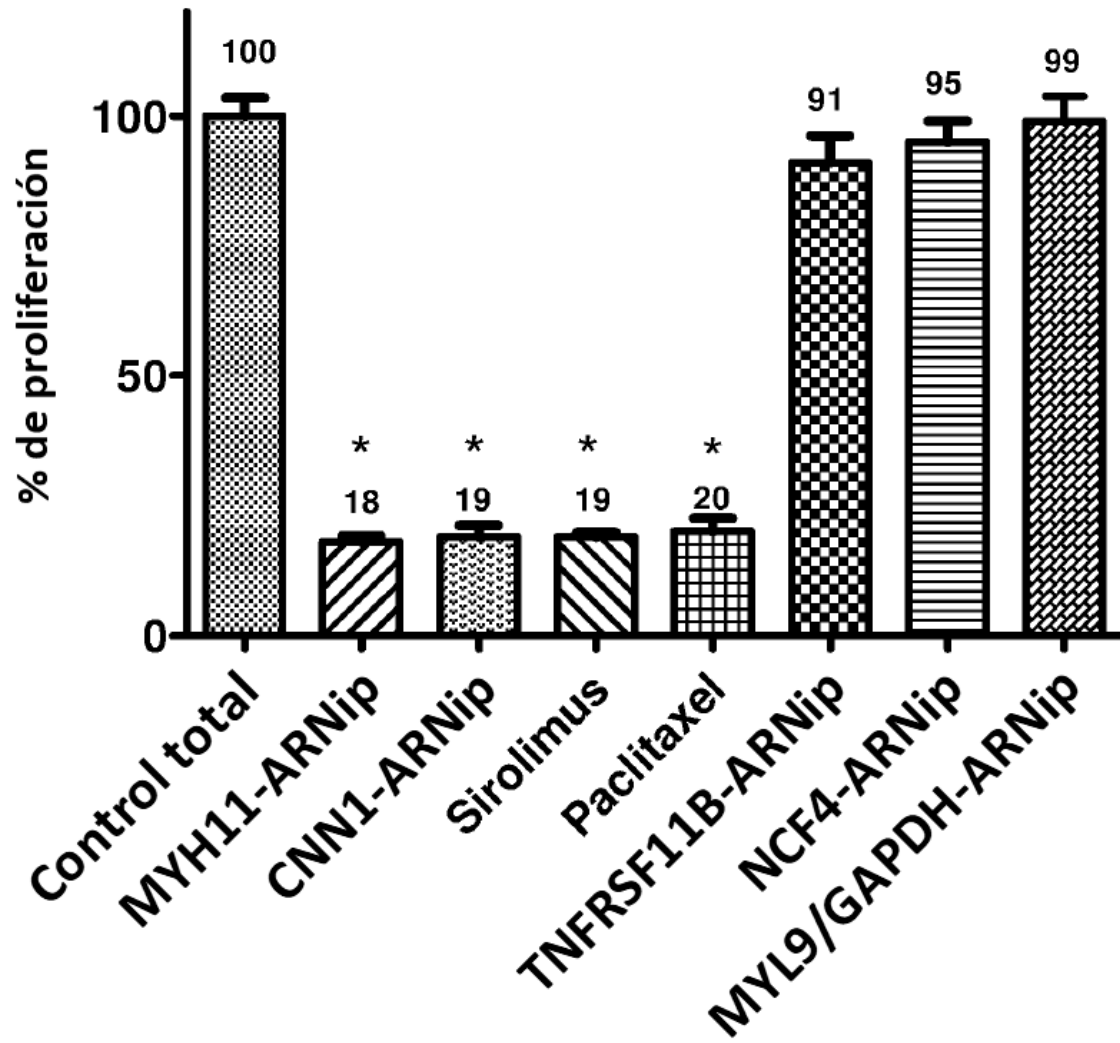


Fig. 5



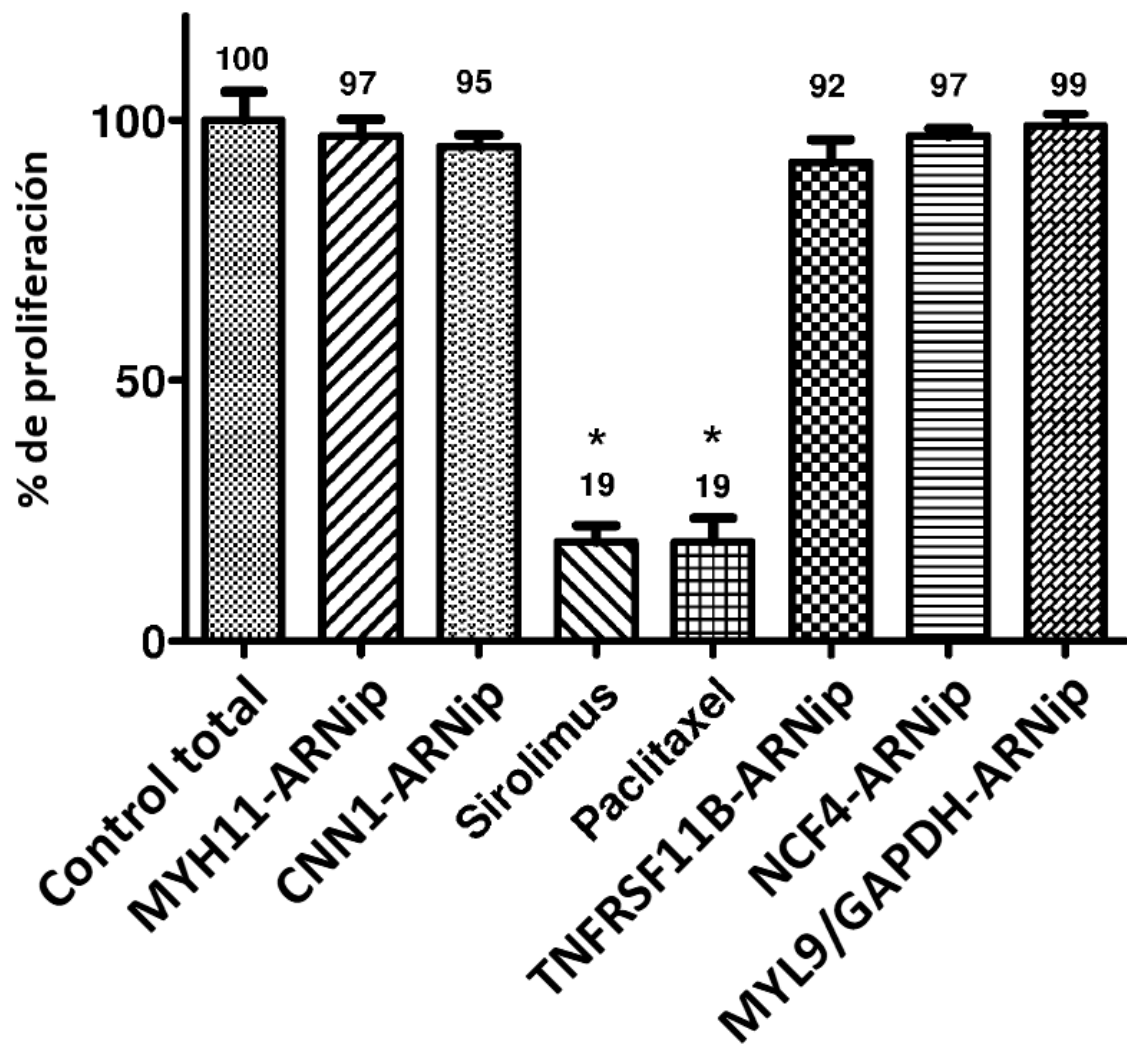
* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 6



* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 7



* representa la diferencia estadísticamente significativa desde el grupo de control completo ($p < 0.0001$).

Fig. 8

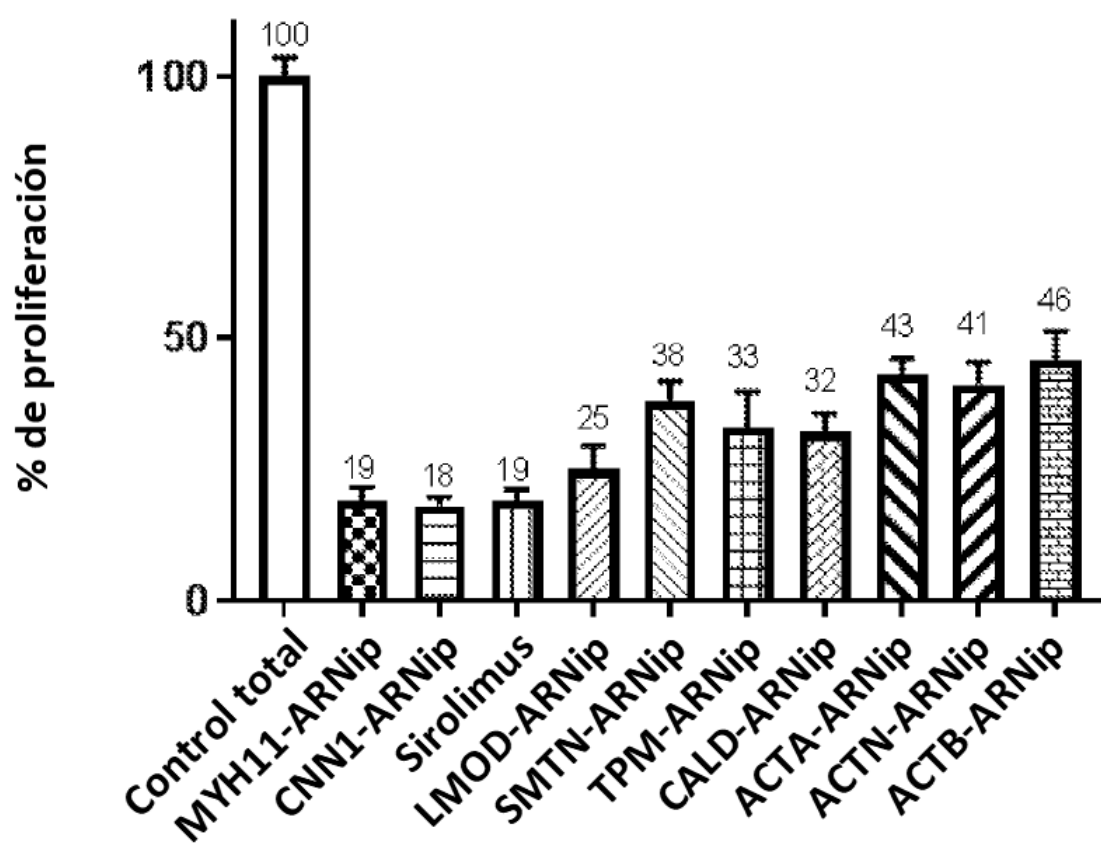


Fig. 9

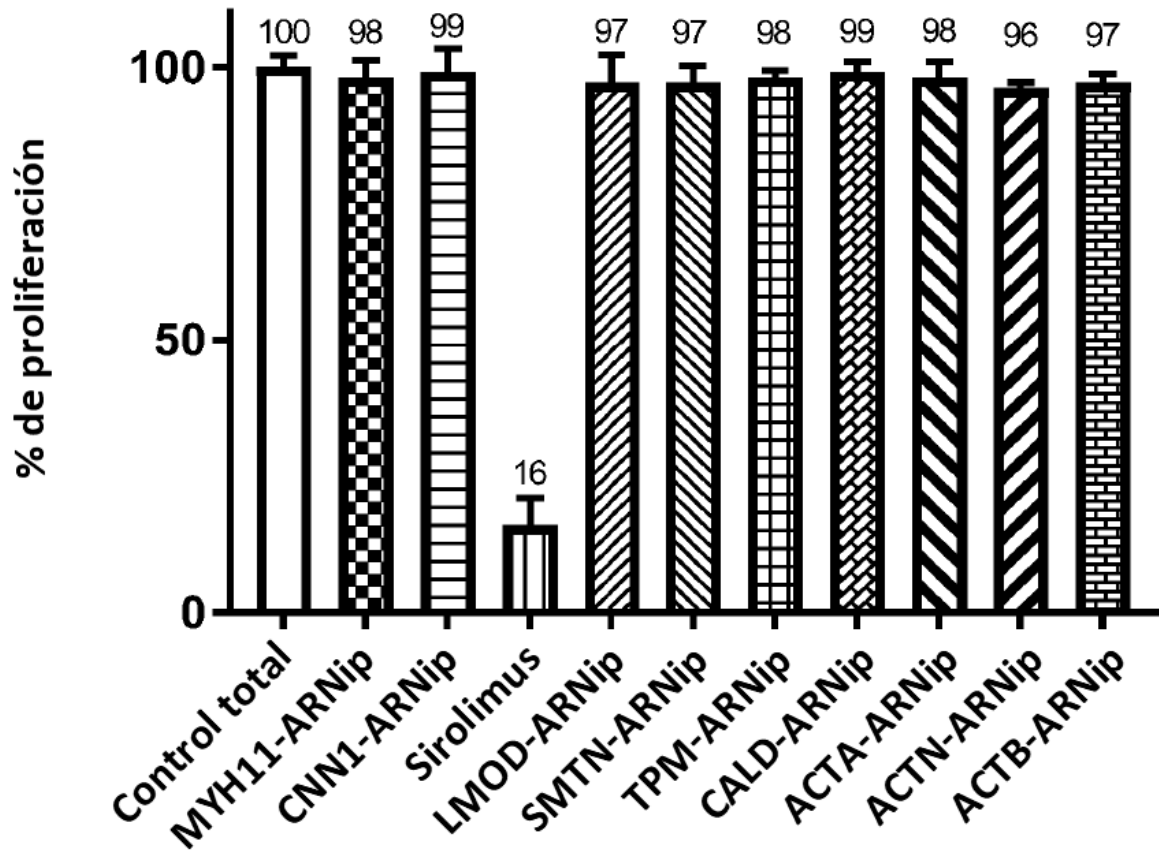


Fig. 10

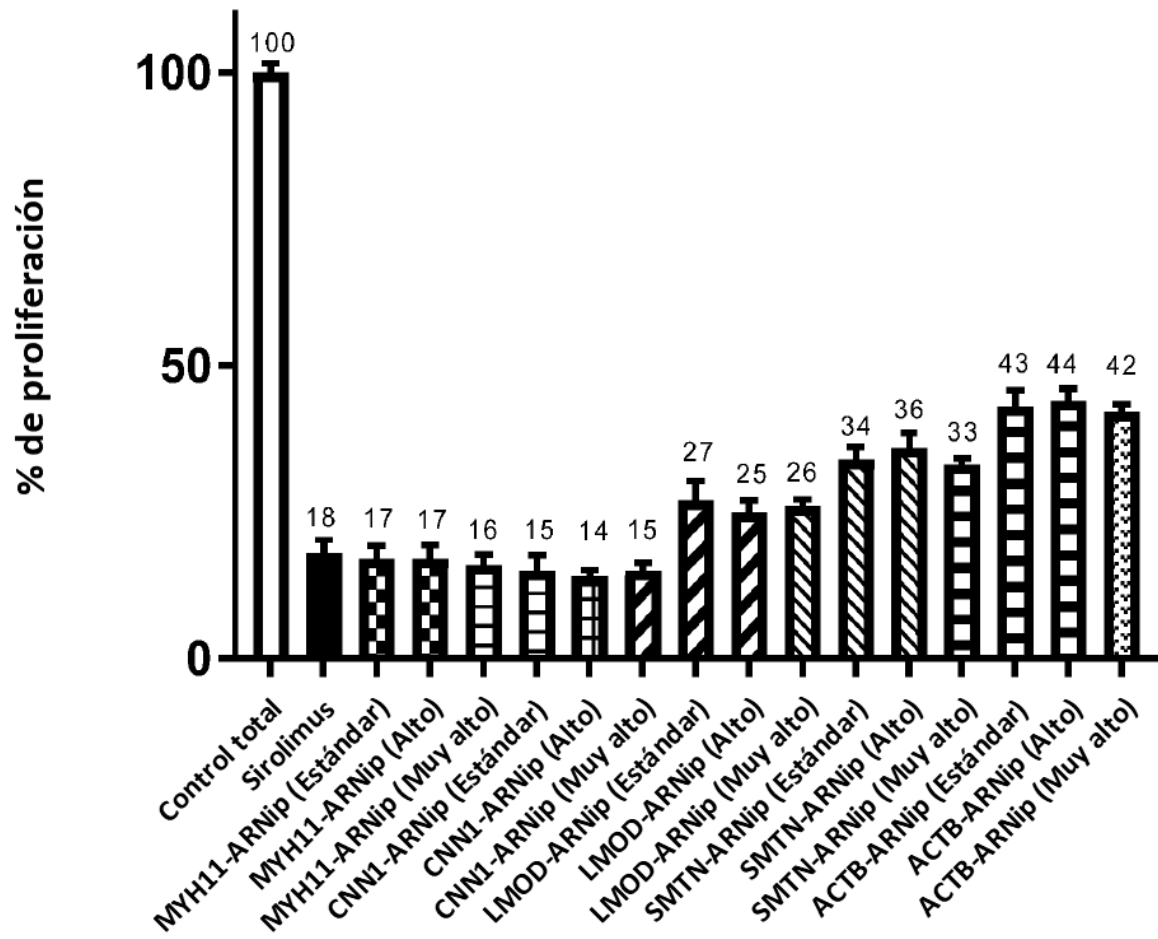


Fig. 11

